

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 029 139**

51 Int. Cl.:

A01N 1/142 (2015.01)

A01N 1/162 (2015.01)

A01N 1/165 (2015.01)

A23B 2/80 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2021 PCT/US2021/012863**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2021 WO21146122**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2021 E 21741918 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2025 EP 4090157**

54 Título: **Dispositivos y métodos para superenfriamiento de alta estabilidad de medios acuosos y materia biológica**

30 Prioridad:

13.01.2020 US 202062960524 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.06.2025

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.00%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**POWELL-PALM, MATTHEW J. y
RUBINSKY, BORIS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 3 029 139 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivos y métodos para superenfriamiento de alta estabilidad de medios acuosos y materia biológica

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos y dispositivos para superenfriar soluciones o suspensiones acuosas que contienen materia biológica en las mismas en condiciones isocóricas.

10 **Introducción**

Se considera que un líquido tal como agua está termodinámicamente "superenfriado" cuando se lleva a una temperatura por debajo de su punto de congelación en equilibrio, pero permanece en un estado líquido. Este proceso es extremadamente útil en el campo médico, permitiendo la conservación a largo plazo de materiales biológicos sensibles tales como tejidos y órganos reduciendo su temperatura y deteniendo su metabolismo mientras que los protege simultáneamente de daños por formación de hielo. Sin embargo, el superenfriamiento es un proceso termodinámicamente metaestable; un líquido en un estado superenfriado puede desestabilizarse y convertirse en su estado sólido (por ejemplo, puede congelarse) incluso tras una agitación suave del sistema, o debido a procesos espontáneos [1]. Por lo tanto, las técnicas de superenfriamiento se limitan actualmente a su uso en entornos de laboratorio extremadamente controlados y estacionarios. Se requieren nuevos métodos y dispositivos para mejorar la estabilidad del superenfriamiento con el fin de hacer que los sistemas superenfriados sean transportables, fiables para almacenamiento a largo plazo, y clínicamente relevantes.

La interrupción del estado superenfriado metaestable y la nucleación de hielo resultante pueden ser causadas por una variedad de factores, incluyendo estimulación mecánica o vibratoria [2], estimulación ultrasónica [3-5], fluctuaciones de densidad microscópica térmica aleatoria [6], inestabilidades de la superficie de contacto fluido-fluido, interacción heterogénea con superficies sólidas o superficies de contacto gaseosas [6,7], y cavitación de burbujas de gas dentro del líquido [4,8,9]. Así, para maximizar la estabilidad de un sistema superenfriado, deben desarrollarse dispositivos y métodos que combatan simultáneamente todos estos métodos de desestabilización.

La mayoría de los esfuerzos tecnológicos anteriores que tenían como objetivo aumentar la estabilidad del agua superenfriada han abordado solo uno de estos mecanismos de desestabilización, interacciones superficie/interfase entre el agua y sus alrededores. Por ejemplo, Usta et al. desarrollaron un método para sellar la superficie libre de agua superenfriada con un líquido inmiscible tal como un aceite, lo que reivindicaron que reduce la probabilidad de nucleación eliminando aire como un sitio de nucleación heterogéneo (Usta et al., solicitud de patente internacional número PCT/US20 19/0 16346). De manera similar, Aizenberg et al. han desarrollado una variedad de revestimientos superficiales porosos impregnados con líquidos hidrófobos (típicamente sustancias perfluoradas) con el fin de reducir la nucleación heterogénea de hielo sobre las superficies de los recipientes (Aizenberg et al., patente de EE. UU. n.º 9,932,484). En la bibliografía se informan dos excepciones notables a estos esfuerzos de superficie/interfase. Una incluye un intento de mejorar el superenfriamiento mediante el uso de campos magnéticos o eléctricos (Jun et al., n.º de patente 10,111,452). La segunda emplea sistemas de volumen constante para reducir la probabilidad de nucleación aleatoria de hielo (Rubinsky et al., solicitud de patente de EE. UU. n.º 11/485,922). Sin embargo, aunque todos los trabajos referenciados intentan reducir la probabilidad de nucleación de hielo, ninguno de estos estudios aborda específicamente los innumerables mecanismos de desestabilización asociados con el transporte y el uso clínico a largo plazo, incluyendo estimulación mecánica, estimulación ultrasónica, cavitación, inestabilidades de la superficie de contacto fluido-fluido, mayor probabilidad de fluctuaciones de densidad, etc. Para que el superenfriamiento se convierta en un método práctico para la conservación, estos aspectos no pueden ignorarse.

En la presente divulgación, los inventores presentan métodos y dispositivos basados en fenómenos termodinámicos, cinéticos y dinámicos de fluidos recientemente realizados para mejorar drásticamente la estabilidad a largo plazo de sistemas superenfriados expuestos a una amplia variedad de agitaciones externas, incluyendo vibración, impacto agudo, ultrasonificación y fluctuación térmica. Los autores describen cómo estos métodos y dispositivos pueden usarse para la conservación de calidad clínica a largo plazo, transportable y a prueba de fallos de materia biológica sensible tal como moléculas orgánicas, tejidos, órganos y organismos. Además, aunque estos métodos se describen principalmente en el contexto de la conservación de materia biológica tal como moléculas orgánicas, tejidos, órganos y organismos, son igualmente relevantes para todos los contextos que requieren superenfriamiento estable y predecible, incluyendo diversos procesos metalúrgicos [10, 11], procesamiento de semiconductores [12], almacenamiento en frío de productos alimenticios [13], etc.

Preciado y Rubinsky [34] divulgan un recipiente a presión diseñado para validar que la conservación isocórica (volumen constante) minimiza automáticamente la presión de una temperatura dada. El recipiente se usa, por ejemplo, para examinar el efecto de un entorno isocórico sobre la nucleación del punto de congelación en una solución acuosa de proteína anticongelante y para generar diagramas de fase de presión-temperatura para diversas soluciones crioprotectoras. La cámara del recipiente se instrumentó con un transductor de presión

para medir continuamente la presión interna de la cámara, y se proporcionaron dos termistores para evaluar la temperatura interna de la cámara. El recipiente se enfrió a -20°C usando un baño frío mientras se supervisaba la temperatura y la presión. El comienzo de un aumento de presión se usó para determinar el punto temporal de nucleación. Una vez que la presión comenzó a aumentar, el recipiente se retiró del baño frío y se descongeló en agua caliente.

En la publicación de patente internacional WO2019/032889 A1 se describe un proceso para la criopreservación controlada por temperatura y presión de muestras mediante el uso de sistemas isocóricos, que incluye un proceso para identificar si una muestra biológica ha experimentado o no un proceso de criopreservación de vitrificación y/o desvitrificación.

Compendio de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La invención proporciona métodos y dispositivos para el superenfriamiento de alta estabilidad de soluciones o suspensiones acuosas, y la conservación de materia biológica en las mismas, se proporcionan métodos y dispositivos como se definen en las reivindicaciones adjuntas para mantener el superenfriamiento termodinámico transportable y de alta estabilidad a largo plazo de un medio acuoso en un sistema de volumen constante (isocórico), en donde pueden almacenarse materiales biológicos a temperaturas por debajo del punto de congelación de equilibrio del medio sin formación de hielo.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para inducir superenfriamiento de alta estabilidad y opcionalmente transportable, comprendiendo el método:

proporcionar un dispositivo que comprende un recipiente rígido que contiene materia biológica en un medio acuoso;

asegurar la eliminación de esencialmente toda la fase gaseosa a granel del medio acuoso contenido;

sellar herméticamente el recipiente con un cierre rígido hermético al aire, en donde el porcentaje del volumen de fase gaseosa a granel que queda en el medio acuoso tras sellar el recipiente es menor del 5%; y

enfriar el medio acuoso a una temperatura inferior a 0°C en condiciones termodinámicas isocóricas,

en donde el recipiente comprende además un instrumento de detección de presión integrado o no integrado, un instrumento de control y un instrumento de suministro de energía,

en donde el instrumento de detección de presión mide o detecta presión, en donde se usa un cambio en la presión para detectar la formación o eliminación de hielo dentro del medio acuoso,

en donde el instrumento de suministro de energía usa un mecanismo de suministro de energía seleccionado del grupo que consiste en calentamiento conductor, calentamiento convectivo, calentamiento radiativo, calentamiento inductivo, calentamiento por efecto Joule, calentamiento electromagnético, calentamiento por radio y calentamiento ultrasónico,

en donde el instrumento de suministro de energía suministra energía para fundir, disolver o eliminar de otro modo núcleos o cristales de hielo, y

en donde tras la detección de un cambio de presión, se activa una rutina dentro del instrumento de control, en donde el instrumento de control monitoriza continuamente la presión, y la rutina activa el instrumento de suministro de energía cuando la lectura de presión supera un primer valor umbral dado, y apaga el instrumento de suministro de energía cuando la presión vuelve por debajo del primer valor umbral o un valor umbral diferente.

En otro aspecto, la invención proporciona un dispositivo para inducir un superenfriamiento de medios acuosos de alta estabilidad y opcionalmente transportable, comprendiendo el dispositivo:

un recipiente rígido configurado para contener materia biológica en un medio acuoso, en donde cualquier fase gaseosa a granel en el mismo comprende menos del 5% del volumen del recipiente;

un cierre rígido hermético al aire para sellar el recipiente y mantener las condiciones termodinámicas isocóricas dentro del recipiente que se configura para que el medio acuoso se enfríe a una temperatura por debajo de 0 °C en condiciones termodinámicas isocóricas,

en donde el recipiente está equipado con un instrumento de detección de presión integrado o no integrado, un instrumento de control y un instrumento de suministro de energía,

en donde el instrumento de detección de presión está configurado para medir o detectar presión, en donde el dispositivo está configurado para detectar un cambio en la presión que indica la formación o eliminación de hielo dentro del medio acuoso,

5 en donde el instrumento de suministro de energía usa un mecanismo de suministro de energía seleccionado del grupo que consiste en calentamiento conductor, calentamiento convectivo, calentamiento radiativo, calentamiento inductivo, calentamiento por efecto Joule, calentamiento electromagnético, calentamiento por radio o calentamiento ultrasónico,

10 en donde el instrumento de suministro de energía está configurado para suministrar energía para fundir, disolver o eliminar de otro modo núcleos o cristales de hielo, y

15 en donde el dispositivo está configurado de tal manera que al detectar un cambio de presión, se activa una rutina dentro del instrumento de control, en donde el instrumento de control monitoriza continuamente la presión, y la rutina activa el instrumento de suministro de energía cuando la lectura de presión supera un primer valor umbral dado, y apaga el instrumento de suministro de energía cuando la presión vuelve por debajo del primer valor umbral o un valor umbral diferente.

20 El medio acuoso dentro del recipiente puede ser opcionalmente agua o una solución acuosa que contiene moléculas orgánicas o crioprotectores químicos. Los materiales biológicos pueden ser opcionalmente células, moléculas, construcciones multicelulares, tejidos, órganos u organismos completos humanos o no humanos. El recipiente puede estar hecho opcionalmente de cerámica metálica, o cualquier otro material rígido. Pueden usarse métodos y dispositivos de almacenamiento isocórico para mejorar la estabilidad de superenfriamiento a largo plazo y la capacidad de soportar perturbaciones del sistema.

25 Un elemento clave en esta invención es la constatación de que debido a que la presión cambia con la formación de un primer núcleo de hielo, el recipiente isocórico presenta capacidades intrínsecas de detección de nucleación de hielo en tiempo real que pueden usarse para asegurar la estabilidad continuada del medio superenfriado en presencia de un suceso de nucleación de hielo. La detección de la nucleación se logra incorporando o conectando un medio para monitorizar la presión tal como un transductor o manómetro digital o analógico de presión o una fuente de resistencia eléctrica en el recipiente. Se ha encontrado que bajo superenfriamiento isocórico principalmente libre de aire, un evento de nucleación de hielo da como resultado un aumento en la presión hidrostática, a diferencia de otros sistemas de superenfriamiento. Tal aumento de presión se propagará a través del sistema como una onda sonora, y por lo tanto es detectable a la velocidad del sonido en el agua (aproximadamente 1500 m/s), y puede usarse para detectar un evento de nucleación de hielo en tiempo real. Esta detección de nucleación en tiempo real a alta velocidad no es posible cuando se detecta la nucleación usando monitorización de temperatura, ya que el calor se difunde a través del agua a una velocidad característica mucho más lenta (aproximadamente 10^{-8} m/s).

40 El recipiente presenta además medios integrados o no integrados para suministrar energía al fluido superenfriado para provocar la disolución o fusión de un núcleo o cristal de hielo en crecimiento o estable. En una realización preferida, se puede usar un calentador para fundir cualquier hielo que pueda formar y restablecer el estado de superenfriamiento, asegurando la seguridad total del producto biológico conservado. En comparación con otras condiciones de superenfriamiento, el hielo se forma mucho más lentamente en condiciones isocóricas libres de aire debido a las fuerzas de accionamiento termodinámicas reducidas. La combinación de formación lenta de hielo y detección de nucleación en tiempo real permite la eliminación rápida de cristales de hielo mediante calentamiento controlado inmediato. La energía para el calentamiento puede ser suministrada por una fuente de alimentación o batería integrada o no integrada.

50 El recipiente presenta capacidades de control integradas o no integradas, que pueden emplear un microprocesador, ordenador u otro dispositivo de procesamiento programable para monitorizar la lectura de presión desde el transductor de presión y activar el módulo de suministro de energía (calentamiento) si la lectura de presión supera un valor umbral dado. El controlador supervisará continuamente la presión y desactivará el módulo de suministro de energía (calentamiento) cuando la presión vuelva por debajo del valor umbral, u otro valor según se considere apropiado, indicando que todo o la mayor parte del hielo se ha fundido y que se puede reanudar el estado de superenfriamiento estable. Esto asegura que la temperatura en el sistema se eleva solo hasta justo por encima del punto de fusión del medio y el producto biológico almacenado permanece frío. Se deja entonces que el recipiente vuelva a la temperatura de conservación deseada y se reanuda el superenfriamiento. Esta capacidad de control asegura la seguridad total del producto biológico conservado, incluso si el sistema superenfriado se volviera inestable brevemente.

En algunas realizaciones, si el medio superenfriado se desestabiliza y comienza a formarse hielo por cualquier razón, puede permitirse que crezca y puede continuarse la conservación con o sin interrupción.

65 El enfriamiento del recipiente puede realizarse por inmersión en un baño de enfriamiento externo o por enfriamiento integrado, pudiendo controlarse el proceso de enfriamiento también opcionalmente por el

dispositivo de procesamiento programable mencionado anteriormente. El enfriamiento del recipiente puede proporcionarse mediante líquido, gas o vapor enfriado, mediante refrigeración, mediante material de cambio de fase, mediante enfriador termoeléctrico o peltier, mediante enfriador stirling o mediante cualquier mecanismo de enfriamiento arbitrario.

5 El recipiente puede presentar medidas adicionales para proteger el medio acuoso de la cavitación causada por vibraciones, que pueden causar la nucleación de hielo no deseada. Estas vibraciones pueden encontrarse durante el vuelo, el transporte por tierra o el uso general. Las medidas protectoras pueden incluir un manguito, recubrimiento, soporte u otra característica externa hecha de un material reductor de vibraciones tal como neopreno u otros cauchos, o pueden incluir muelles u otras características mecánicas para la reducción de vibraciones.

15 El recipiente puede presentar medidas adicionales para proteger el medio superenfriado de los cambios de temperatura, lo que puede desestabilizar el sistema y provocar la nucleación, o que puede afectar negativamente al producto biológico almacenado. Dichas medidas pueden incluir opcionalmente una funda, manguito o recubrimiento térmicamente aislantes; un material de cambio de fase circundante; un panel, material o cámara aislado por vacío; o un recipiente o aparato secundario de cualquier tipo destinado a aislar térmicamente el recipiente primario.

20 El recipiente puede presentar medidas adicionales para proteger adicionalmente contra la nucleación heterogénea en superficies de contacto líquido-sólido internas, incluyendo superficies o revestimientos superficiales hidrófobos o superhidrófobos, incluyendo, pero sin limitarse a sustancias a base de politetrafluoroetileno y a base de perfluorocarbono.

25 El medio acuoso empleado puede presentar opcionalmente crioprotectores químicos para modular el intervalo de temperaturas en donde el sistema se superenfía o un aumento en el grado y estabilidad de superenfriamiento a una temperatura de conservación dada, tal como dimetilsulfóxido, etilenglicol, polietilenglicol, 3-OMG, glicerol, proteínas anticongelantes, etc. El medio acuoso también puede incluir cualquier otro soluto o combinaciones de solutos que reduzcan el punto de congelación de la solución, tales como trehalosa, glucosa, fructosa, manitol, betaína, glicina, etc.

35 El recipiente, que aloja un medio superenfriado y/o un producto biológico conservado, puede almacenarse a cualquier temperatura entre 0°C y -273°C, incluyendo -1°C, -2°C, -3°C, -4°C, -5°C, -6°C, -7, -20°C, ..., -273°C. El recipiente también puede enfriarse a cualquier velocidad arbitraria, incluyendo <1°C por minuto, <5°C por minuto, <10°C por minuto, <20°C por minuto, <50°C por minuto,<1000°C por minuto, etc.

40 El producto biológico almacenado puede conservarse dentro del recipiente durante cualquier periodo de tiempo, incluyendo, pero sin limitarse a 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 5 años, 10 años, 20 años.

45 El recipiente puede almacenar productos biológicos de cualquier tipo o escala, incluyendo moléculas orgánicas, células, sangre, médula ósea, vasos sanguíneos, islotes pancreáticos, tejidos reproductores, piel, etc. Puede almacenar órganos completos tales como corazones, hígados, riñones, pulmones, páncreas, bazo, etc.; otros productos biológicos tales como ojos, extremidades completas o parciales, dedos de las manos o de los pies, etc.; tejidos manipulados tales como construcciones de microtejido 3D, construcciones de hígado en un chip, construcciones de pulmón en un chip, construcciones de corazón en un chip, etc.; organismos completos tales como pez cebra, coral, nematodos u otros animales marinos o que habitan en la tierra; y productos alimenticios tales como cerezas, bayas, patatas, tomates, pescado, carne de vaca, etc.

50 El recipiente puede estar hecho de cualquier material rígido, incluyendo metales tales como acero y aleaciones del mismo, aluminio y aleaciones del mismo, titanio y aleaciones del mismo, cobre y aleaciones del mismo, etc.; materiales cerámicos; plásticos tales como acrílico, cloruro de polivinilo, polimetilmetacrilato, poliuretano, etc.; compuestos tales como polímeros reforzados con fibra de carbono (CFRP) o polímeros reforzados con fibra de vidrio (GFRP); o cualquier combinación de los mismos. Este material puede someterse a uno o múltiples tratamientos superficiales, tales como anodización, niquelado, zincado, etc., con el fin de prevenir la corrosión, prevenir la nucleación heterogénea de hielo, mantener la biocompatibilidad, etc.

60 El recipiente puede hacerse hermético al aire mediante un mecanismo de sellado, que incluye juntas tóricas de caucho, juntas tóricas activadas por resorte, contacto de metal sobre metal, juntas de caucho, juntas metálicas, etc. El cierre del recipiente puede hacer uso de una tapa roscada, un tapón roscado, una tapa fijada, una tapa fijada con pernos, una placa o tapón retenido mecánicamente, etc. Dentro del recipiente primario, los productos biológicos conservados también pueden almacenarse opcionalmente en un recipiente secundario, tal como una bolsa, globo, vial o tubo cubierto, u otro recipiente con al menos una superficie flexible capaz de transmitir presión hidrostática desde sus alrededores a su contenido interno. Este recipiente secundario también puede llenarse con una solución acuosa, estar completamente o en su mayor parte libre de aire, y sellarse. Esta

contención secundaria protegerá los productos biológicos del daño osmótico en el caso de que se forme hielo en los medios superenfriados principales (durante un periodo breve o largo).

5 Los productos biológicos conservados dentro del recipiente también pueden recubrirse opcionalmente con o sumergirse en un hidrogel reticulado, tal como alginato de sodio o ácido hialurónico reticulado con calcio u otros reticulantes iónicos, oxidativos o covalentes. Este gel reticulado protegerá los productos biológicos de un posible daño osmótico durante el superenfriamiento estable o durante periodos de nucleación de hielo. Este hidrogel puede estar impregnado con una solución de conservación de órganos o cualquier otra manera de solución acuosa con el interés de mantener el equilibrio osmótico, administrar fármacos, potenciar los efectos
10 anticongelantes, etc.

La solución dentro del recipiente puede ser opcionalmente agua de mar, y los productos biológicos conservados pueden ser opcionalmente organismos marinos o materia. Estos productos biológicos pueden recogerse
15 opcionalmente directamente del océano.

Además, la invención también es útil para proporcionar entornos acuosos que permanecen líquidos a temperaturas inferiores a cero centígrados, y por tanto pueden usarse para facilitar reacciones químicas controladas por temperatura, polimerización, gelificación u otros procesos térmicos o químicos.

20 Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-1B: Comparación de las condiciones termodinámicas isobáricas (T-P) e isocóricas (T-V) para agua y hielo. A. Sistemas isobáricos mantienen contacto con un depósito de presión (la atmósfera en el contexto de este trabajo), y por tanto fluctúan constantemente en densidad a escala microscópica. Las fluctuaciones de
25 densidad pueden conllevar la nucleación de hielo, y a presión atmosférica, el agua en un sistema isobárico se transformará completamente en hielo-1 h a temperaturas por debajo de cero grados centígrados. B. Los sistemas isocóricos se mantienen a volumen constante, aislados de la atmósfera, y por tanto no fluctúan en densidad. El agua en un sistema isocórico no se congelará completamente a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, formando en su lugar un equilibrio bifásico de agua-hielo. Dado que el estado final del sistema es un equilibrio bifásico, la barrera de nucleación a la nucleación en un sistema isocórico será mayor y la velocidad de crecimiento total del hielo tras la nucleación será más lenta.

Figura 2: Esquema de una realización de un dispositivo de superenfriamiento isocórico básico (no según la invención). Un medio acuoso está contenido dentro de un recipiente rígido, sin la fase gaseosa a granel presente y un sello hermético al aire, por lo que no se expone a una atmósfera ni a una fase gaseosa a granel
35 compresible. El volumen limitado, libre de gas a granel crea condiciones termodinámicas isocóricas (volumen constante), elimina todas las superficies de contacto fluido-fluido, elimina fluctuaciones aleatorias de densidad, y disminuye la probabilidad de cavitación, todas las cuales aumentan la estabilidad del superenfriamiento y disminuyen la probabilidad de nucleación de hielo.

Figura 3: Esquema de una realización de un dispositivo de superenfriamiento isocórico que presenta monitorización de presión, una unidad de control, una fuente de alimentación, un instrumento de suministro de energía, un instrumento de enfriamiento y un producto biológico conservado.

Figuras 4A-4D. Paisajes termodinámicos de agua y hielo-1h bajo diferentes condiciones límite termodinámicas. A. Paisaje de energía libre de Gibbs de agua y hielo-1h en un sistema con temperatura y presión variables naturales. La proyección en el plano de temperatura-presión da el diagrama de fase estándar para el agua. B. Paisaje de energía libre de Helmholtz de agua y hielo-1h en un sistema con temperatura y volumen variables naturales (trazado en este caso en forma específica por conveniencia). Las tangentes comunes entre las fases definen el intervalo sobre el cual una mezcla bifásica en equilibrio producirá la menor energía libre del sistema. La pendiente de la tangente común proporciona la presión de equilibrio del sistema. C. Diagrama de fases T-V para agua y hielo-1h. D. Fracción de fase de hielo-1h como una función de la temperatura a varios volúmenes específicos del sistema.

Figura 5. Formulación conceptual del proceso de nucleación en un sistema isocórico. Para un núcleo de hielo de volumen absoluto V_{hielo} en un sistema de volumen absoluto V_{sistema} , el volumen específico y la energía libre de cada fase se pueden encontrar identificando los puntos en cada curva que satisfarán la conservación de la masa del sistema, el volumen absoluto y el volumen específico, mientras se producen líneas tangentes que son paralelas entre sí, lo que indica la continuidad de la presión en todo el sistema.

Figuras 6A-6D. Cinética de nucleación en sistemas isocóricos. A. Cambio de energía libre total $\Delta\Phi$ que acompaña a la formación de un núcleo de hielo esférico-1h en función del radio. Los componentes de energía interfaciales, de crecimiento isocórico y libre en masa que contribuyen al total se representan de forma independiente. B. $\Delta\Phi$ curvas para volúmenes absolutos variables del sistema. El límite de Gibbs da el comportamiento del sistema al límite de volumen infinito del sistema, y el límite de Helmholtz en el volumen crítico del sistema, en donde la curva de energía libre comienza a aumentar monótonamente. C. Radio crítico

como una función del volumen del sistema para diversas temperaturas, con volúmenes críticos del sistema marcados. D. Diagrama de fases que mapea el volumen crítico del sistema como una función de la temperatura. En el régimen dominado cinéticamente, todas las curvas $A\Phi$ aumentarán monótonamente, y por tanto no existirá ninguna ruta cinética para la nucleación. Todos estos escenarios representan la formación de un único núcleo de hielo; por lo tanto, en un sistema masivo en donde millones o miles de millones de núcleos de hielo están intentando formarse simultáneamente, se anticipa que el efecto de interpresurización entre los diversos núcleos aumentará las barreras de nucleación y disminuirá las probabilidades de nucleación incluso en volúmenes masivos.

5

10

Figuras 7A-B: Frecuencia de nucleación tras la exposición a perturbaciones externas para sistemas isobáricos, isobáricos sellados con aceite e isocóricos convencionales. A. Frecuencia de nucleación para todos los sistemas en función del tipo de perturbación. Las líneas continuas y los marcadores representan cámaras de 75 ml, las líneas de puntos y los marcadores huecos representan cámaras de 125 ml. B. Resultados para cada tipo de perturbación agrupados por tipo y volumen de sistema. Las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los tipos de sistema en un volumen dado están marcadas por letras diferentes. Las diferencias significativas entre los volúmenes de un tipo de sistema dado están marcadas con un asterisco (*). Los valores marcados proporcionan la media y las barras de error proporcionan la desviación estándar.

15

20

Figura 8: Vista de montaje dimensionada de un diseño opcional de tres partes para el recipiente base usado en los métodos y dispositivos de superenfriamiento isocórico principalmente libres de aire. Este diseño incluye un cuerpo cilíndrico, un tapón de sellado diseñado a medida y una tapa roscada de alta resistencia.

25

Figura 9: Dibujo mecánico de la parte de cuerpo cilíndrico de un diseño opcional de tres partes para el recipiente base usado en los métodos y dispositivos de superenfriamiento isocórico principalmente libres de aire.

30

Figura 10: Dibujo mecánico de la parte de tapón de sellado de un diseño opcional de tres partes para el recipiente base usado en los métodos y dispositivos de superenfriamiento isocórico principalmente libres de aire.

35

Figura 11: Dibujo mecánico de la parte de tapa de gran resistencia de un diseño opcional de tres partes para el recipiente base usado en métodos y dispositivos de superenfriamiento isocórico principalmente libres de aire.

40

Figura 12: Dibujo de una configuración opcional de un dispositivo de superenfriamiento isocórico principalmente libre de aire que presenta detección de nucleación en tiempo real basada en presión, control digital, calentamiento por efecto Joule sensible para la contención de eventos de desestabilización, un manguito de aislamiento de vibración de caucho blando para proteger contra la nucleación de hielo inducida por vibración, y contención secundaria del producto biológico conservado para protección adicional contra daño osmótico potencial y de crecimiento de hielo.

45

Figura 13: Presión de la muestra y trayectoria de calentamiento de un dispositivo de superenfriamiento isocórico principalmente libre de aire cuando el medio superenfriado se desestabiliza artificialmente y se induce la nucleación de hielo. El aumento de presión que acompaña a la formación de hielo activa un calentamiento local del recipiente, que continúa hasta que los cristales de hielo se han disipado (como se señala por la disipación de presión) y puede reanudarse el superenfriamiento.

50

Descripción de realizaciones particulares de la invención

55

La conservación eficaz de sistemas complejos de órganos y tejidos es esencial para un amplia gama de esfuerzos médicos y de investigación del siglo XXI [14], incluyendo el acceso ampliado a trasplantes de órganos que salvan vidas, permitiendo el almacenamiento y transporte de tejidos manipulados para pruebas de fármacos, etc. Aunque los enfoques clásicos a la conservación han incluido a menudo altas dosis de productos químicos crioprotectores para evitar daños por la formación de hielo, una nueva generación de protocolos está aprovechándose del superenfriamiento termodinámico para aumentar drásticamente la duración y la calidad de la bioconservación mientras se minimizan las concentraciones de crioprotectores [7, 15-17].

60

Aunque este enfoque ha producido fuertes resultados biológicos tempranos en el laboratorio, la reducción de estos protocolos a practicar en un entorno clínico o industrial se enfrenta a una limitación fundamental: estabilidad termodinámica [18]. El superenfriamiento es un estado termodinámico metaestable, en donde una sustancia permanece líquida a temperaturas por debajo de su punto de congelación debido a la falta de suficientes estímulos cinéticos. Incluso con ligeras agitaciones, un sistema superenfriado puede congelarse instantánea y destructivamente, volviendo al equilibrio termodinámico y destruyendo cualquier producto biológico conservado. Esto también puede ocurrir aleatoriamente después de períodos de conservación suficientemente largos, porque la probabilidad de nucleación de hielo es una función del tiempo. Así, con el fin de desarrollar protocolos de conservación de superenfriamiento que sean practicables fuera de un entorno de laboratorio altamente controlado, se buscan nuevos métodos a largo plazo, transportables y clínicamente convenientes, que mejoren la estabilidad de sistemas superenfriados.

65

Se presenta en este caso un método de superenfriamiento isocórico (volumen constante) que mejore en gran medida la estabilidad del agua superenfriada frente a una gama de perturbaciones mecánicas y térmicas minimizando los efectos de muchos mecanismos de nucleación de hielo diferentes. Sin estar limitados por la teoría, también se presentan varias explicaciones posibles referentes a los mecanismos fundamentales que contribuyen a esta mejora, unificando factores que proceden de la termodinámica, la dinámica de fluidos y la cinética. Los resultados de la presente memoria se han puesto en uso inmediato en la conservación de materia biológica sensible, con un efecto excelente.

Superenfriamiento isocórico (volumen constante)

La nucleación de una fase de hielo estable a partir de agua superenfriada (metaestable) se produce cuando una perturbación dentro del sistema demuestra ser suficientemente grande para impulsar la energía libre de un grupo de moléculas líquidas sobre la barrera de nucleación [6]. Tales perturbaciones pueden provenir de las fluctuaciones microscópicas aleatorias constantes experimentadas por cualquier sistema con temperatura finita, o de la agitación micro o macroscópica mecánica o térmica [2,3,19]. Por lo tanto, para que una técnica de conservación basada en superenfriamiento se vuelva práctica o clínicamente relevante, debe mantener la estabilidad no solo cuando experimenta fluctuaciones microscópicas, sino también cuando experimenta agitaciones macroscópicas que caracterizan el uso práctico y la movilidad, incluyendo, conservación a largo plazo, movimiento, vibración macroscópica, impacto con superficies rígidas, cambios de temperatura, etc.

La mayoría de los protocolos de conservación del superenfriamiento operan en condiciones isotérmicas (temperatura constante) e isobáricas (presión constante). Según la termodinámica estadística, los sistemas en contacto con un depósito de temperatura (tal como un baño de enfriamiento) y un depósito de presión (la atmósfera) son libres de fluctuar en energía y volumen [20] (o densidad si la masa es constante), los conjugados extensivos de temperatura y presión (Fig. 1A, izquierda). Por lo tanto, los sistemas en condiciones isobáricas están experimentando constantemente fluctuaciones de densidad microscópica debido al movimiento aleatorio de las partículas, lo que puede conducir a la formación de agrupaciones de hielo que cumplen y superan el tamaño crítico requerido para la nucleación. Además, cuando se exponen a perturbaciones macroscópicas, los sistemas isobáricos en contacto con la atmósfera son susceptibles al movimiento del fluido de masa y a la mezcla de masa con aire, lo que también puede conducir a la nucleación a través de la cavitación o la introducción de nuevos sitios de nucleación [7,8,19].

Los sistemas isocóricos (volumen constante), por su propia definición, no fluctúan microscópicamente en densidad [20] (Fig. 1B, izquierda), y restringen el movimiento de la masa del líquido contenido. Además, se ha demostrado que tanto el proceso de nucleación y crecimiento del hielo como los equilibrios fundamentales de fase agua-hielo son diferentes en condiciones isocóricas: Como se observa comparando los diagramas de fase T-P y T-V para el agua pura (Fig. 1A/B, derecha), la nucleación a presión constante produce una congelación completa, mientras que la nucleación a volumen constante produce solo una congelación parcial, dando como resultado un equilibrio bifásico agua-hielo. Este equilibrio bifásico final tiene innumerables consecuencias útiles, y se ha demostrado teóricamente que entre estas consecuencias pueden estar las barreras de nucleación aumentadas y las fuerzas impulsoras termodinámicas reducidas para la nucleación (véase el ejemplo 1 a continuación). Adicionalmente, en sistemas isocóricos, todas las interfases fluido-fluido se eliminan y el movimiento de masa del agua está totalmente limitado; esto minimiza drásticamente la posibilidad de eventos de cavitación que pueden iniciar la nucleación de hielo, elimina la oportunidad de inestabilidades de interfase fluido-fluido que pueden iniciar la nucleación de hielo, y elimina cualquier oportunidad de nucleación heterogénea de hielo en una burbuja o superficie de una fase líquida gaseosa o secundaria.

La suma total de estas consideraciones termodinámicas, cinéticas y fluidodinámicas demuestra que las condiciones isocóricas aumentan el superenfriamiento a través de innumerables medios diferentes pero complementarios, cuya combinación proporciona un nivel de estabilidad y protección contra la nucleación de hielo que ni tiene precedentes ni está reivindicado en otras tecnologías. Basándose en estas consideraciones, que se clarifican adicionalmente en los ejemplos que siguen, se reivindica que los métodos y dispositivos descritos en esta divulgación, que emplean universalmente condiciones isocóricas, pueden usarse para producir una estabilidad de superenfriamiento mejorada.

Descripción de los métodos y dispositivos

La invención proporciona métodos y dispositivos como se definen en las reivindicaciones adjuntas para mantener una alta estabilidad a largo plazo y opcionalmente un superenfriamiento termodinámico transportable de medios acuosos en un sistema de volumen constante (isocórico), en donde los materiales biológicos pueden almacenarse a temperaturas por debajo del punto de congelación de equilibrio de los medios sin formación de hielo.

La configuración más básica de este dispositivo se presenta esquemáticamente en la Figura 2 (no según la invención). En esta y futuras figuras, el término "fase gaseosa a granel" se toma para significar burbujas u otras configuraciones de una o múltiples fases gaseosas no disueltas que comprenden un volumen termodinámicamente apreciable del sistema, que puede ser opcionalmente igual a >1%, >2%, >3%, o >4%.

Cualquier gas disuelto se toma como un componente del medio acuoso superenfriado. El recipiente rígido indicado puede estar construido de cualquier material rígido, tal como un metal o una aleación metálica, vidrio, cerámica, polímero, plástico, caucho duro, material compuesto, o cualquier combinación de los mismos. El recipiente rígido también puede construirse con cualquier geometría arbitraria, incluyendo cilíndrica, esférica, rectilínea, y cualquier combinación de las mismas. El cierre estanco al aire puede construirse utilizando cualquier mecanismo arbitrario de sellado o retención, tal como un sello a base de junta tórica o junta, sello de contacto metal-metal, sello roscado, etc.

La invención es óptimamente adecuada para la conservación de materia biológica, que se logra mediante: colocar medios acuosos y compuesto(s) biológico(s) en un recipiente rígido: retirar toda o la mayor parte de la fase gaseosa a granel del recipiente; sellar el recipiente con un cierre hermético al aire, induciendo así condiciones isocóricas; prevenir la cavitación, los efectos e inestabilidades de la superficie de contacto fluido-fluido, el movimiento a granel de los medios, o fluctuaciones de densidad induciendo condiciones isocóricas; prevenir la nucleación de hielo evitando la cavitación, los efectos e inestabilidades de la superficie de contacto fluido-fluido, el movimiento a granel de los medios, o fluctuaciones de densidad. El medio acuoso dentro del recipiente puede ser opcionalmente agua o una solución acuosa que contiene moléculas orgánicas o crioprotectores químicos. Los productos biológicos conservados pueden ser opcionalmente células, construcciones multicelulares, tejidos, órganos u organismos completos humanos o no humanos. Los métodos y dispositivos de almacenamiento isocórico pueden usarse para mejorar la estabilidad de la conservación y superenfriamiento a largo plazo y la capacidad de soportar perturbaciones del sistema.

En otras realizaciones preferidas, puede incorporarse cualquier número de instrumentos de detección y control en un dispositivo de superenfriamiento isocórico. La Figura 3 representa esquemáticamente una realización preferida del dispositivo en donde se incorporan capacidades de monitorización de presión, capacidades de control activo, capacidades de suministro de energía y capacidades de enfriamiento.

Dado el hecho de que el hielo es menos denso que el agua líquida, a volumen constante, la nucleación de hielo provocará un aumento inmediato de la presión hidrostática. Debido a los cambios de presión con la formación de un primer núcleo de hielo, los recipientes isocóricos presentan capacidades intrínsecas de detección de nucleación de hielo en tiempo real que pueden usarse para asegurar la estabilidad continuada de los medios superenfriados. La detección de la nucleación se logra incorporando o conectando un medio para monitorizar la presión, tal como un transductor o manómetro digital o analógico de presión o una fuente de resistencia eléctrica, en, sobre o en comunicación con el recipiente. Se ha encontrado que bajo superenfriamiento isocórico, un evento de nucleación de hielo da como resultado un aumento fácilmente detectable en la presión hidrostática, a diferencia de otros sistemas de superenfriamiento no isocórico. Dicho aumento de presión se propagará a través del sistema como una onda sonora y, por lo tanto, es detectable a la velocidad del sonido en el agua (aproximadamente 1500 m/s), lo que permite la detección en tiempo real de eventos de nucleación. Esta detección de nucleación en tiempo real a alta velocidad no es posible cuando se intenta detectar la nucleación usando monitorización de temperatura, ya que el calor se difunde a través del agua a una velocidad característica mucho más lenta (aproximadamente 10^{-8} m/s), y puede usarse no solo para monitorizar la estabilidad sino también para desencadenar diversas acciones de re-estabilización, tales como fusión controlada de cristales de hielo emergentes.

El recipiente presenta además medios integrados o no integrados para suministrar energía al fluido superenfriado para provocar la disolución o fusión de un núcleo o cristal de hielo en crecimiento o estable. En una realización preferida, un calentador situado dentro o fuera del recipiente puede usarse para fundir cualquier hielo que pueda formarse y restablecer el estado de superenfriamiento, asegurando la seguridad total del producto biológico conservado. En comparación con otras condiciones de superenfriamiento, el hielo se forma mucho más lentamente en condiciones isocóricas libres de aire debido a las fuerzas de accionamiento termodinámicas reducidas. La combinación de formación lenta de hielo y detección de nucleación en tiempo real permite la eliminación rápida de cristales de hielo mediante calentamiento controlado inmediato. La energía para el calentamiento puede ser suministrada por una fuente de alimentación o batería integrada o no integrada. Los medios usados para proporcionar la energía requerida para la fusión o disolución de la fase de hielo se describen en las reivindicaciones e incluyen calentamiento por efecto Joule, calentamiento inductivo, calentamiento ultrasónico, calentamiento electromagnético, etc.

El recipiente presenta capacidades de control integradas o no integradas, que pueden emplear en realizaciones preferidas un microprocesador, ordenador u otro dispositivo de procesamiento programable para monitorizar la lectura de presión desde el transductor de presión y activar el módulo de suministro de energía (calentamiento) si la lectura de presión supera un valor umbral dado. El controlador supervisa continuamente la presión y apaga el módulo de suministro de energía (calentamiento) cuando la presión vuelve por debajo del valor umbral, u otro valor según se considere apropiado, indicando que todo o la mayor parte del hielo se ha fundido y que se puede reanudar el estado de superenfriamiento estable. Esto asegura que la temperatura en el sistema se eleva solo hasta justo por encima del punto de congelación del medio y el producto biológico almacenado permanece frío y conservado. Se deja entonces que el recipiente vuelva a la temperatura de conservación deseada y se reanuda el superenfriamiento. Esta capacidad de control asegura la seguridad total del producto

biológico conservado, incluso si el sistema superenfriado se volviera inestable brevemente, y es único para los sistemas isocóricos y sin precedentes en el campo del superenfriamiento.

5 En algunas realizaciones adicionales, si el medio superenfriado se desestabiliza y comienza a formarse hielo por cualquier razón, también puede dejarse crecer y puede continuarse la conservación con o sin interrupción. Las condiciones isocóricas ofrecen una capa adicional de protección para productos biológicos en el caso de desestabilización, porque sólo parte del sistema se convertirá en hielo después de la nucleación, dando como resultado un equilibrio bifásico hielo-agua estable. Según el diagrama de fase T-V proporcionado en la Figura 10 1B. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el producto biológico puede continuar la conservación libre de hielo o parcialmente congelada dentro del recipiente isocórico después de que el hielo se haya nucleado y se haya permitido que crezca. Esta protección secundaria de los productos biológicos inicialmente superenfriados es también única para los sistemas isocóricos.

15 En algunas realizaciones, se puede usar un recipiente secundario para alojar uno o múltiples recipientes isocóricos primarios. En algunas realizaciones, se puede usar un recipiente secundario para alojar uno o múltiples recipientes isocóricos primarios con fines de transporte. En algunas realizaciones, el recipiente secundario puede incluir medidas para proteger el/los recipiente(s) primario(s) alojado(s) frente a cambios de temperatura, vibración, estimulación ultrasónica, contaminación, desesterilización o cualquier otro tipo de perturbación. En algunas realizaciones, se puede usar un recipiente secundario que mejora específicamente 20 la adecuación del recipiente primario para el transporte aéreo, terrestre o marítimo.

En algunas realizaciones, se puede construir un único dispositivo que incluya más de un recipiente isocórico. En algunas realizaciones, dos o más de estos recipientes isocóricos pueden sellarse mediante el mismo mecanismo o diferentes. En algunas realizaciones, el recipiente puede enfriarse por inmersión en un baño de 25 enfriamiento externo o por enfriamiento integrado, y el proceso de enfriamiento también puede controlarse opcionalmente por el dispositivo de procesamiento programable mencionado anteriormente. El enfriamiento del recipiente puede proporcionarse mediante líquido, gas o vapor enfriado, mediante refrigeración, mediante material de cambio de fase, mediante enfriador termoeléctrico o peltier, mediante enfriador stirling o mediante cualquier mecanismo de enfriamiento arbitrario. En algunas realizaciones, el enfriamiento del recipiente puede ser activo, como se proporciona por ejemplo por refrigeración, y en otras realizaciones puede ser pasivo, como se proporciona por ejemplo por un material de cambio de fase tal como hielo o una sal eutéctica. 30

En algunas realizaciones, el recipiente puede presentar medidas adicionales para proteger el medio acuoso superenfriado de la cavitación provocada por vibraciones, que pueden provocar la nucleación de hielo no deseada. Estas vibraciones pueden encontrarse durante el vuelo, el transporte por tierra o el uso general. Las 35 medidas protectoras pueden incluir un manguito, recubrimiento, soporte u otra característica externa hecha de un material reductor de vibraciones tal como neopreno u otros cauchos, o pueden incluir muelles u otras características mecánicas para la reducción de vibraciones. En algunas realizaciones, un recipiente isocórico primario puede colocarse en un recipiente secundario con el propósito de reducción, aislamiento o protección de vibraciones. 40

En algunas realizaciones, el recipiente puede presentar medidas adicionales para proteger el medio superenfriado de los cambios de temperatura, lo que puede desestabilizar el sistema y provocar la nucleación, o que puede afectar negativamente al producto biológico almacenado. Dichas medidas pueden incluir 45 opcionalmente una funda, manguito o recubrimiento térmicamente aislante; un material de cambio de fase circundante; un panel, material o cámara aislado por vacío; o un recipiente o aparato secundario de cualquier tipo destinado a aislar térmicamente el recipiente primario.

En algunas realizaciones, el recipiente puede presentar medidas adicionales para proteger adicionalmente 50 contra la nucleación heterogénea en interfases líquido-sólido internas, incluyendo superficies hidrófobas o superhidrófobas o revestimientos superficiales, incluyendo pero sin limitarse a sustancias a base de politetrafluoroetileno y a base de perfluorocarbono.

En algunas realizaciones, los medios acuosos empleados pueden presentar opcionalmente crioprotectores 55 químicos para modular el intervalo de temperaturas en el que el sistema se superenfriaba o un aumento en el grado y estabilidad de superenfriamiento a una temperatura de conservación dada. En algunas realizaciones, tales crioprotectores pueden incluir dimetilsulfóxido, etilenglicol, polietilenglicol, 3-OMG, glicerol, etc. Los medios acuosos también pueden incluir cualquier otro soluto o combinaciones de solutos que reduzcan el punto de congelación de la solución, incluyendo, pero sin limitarse a, trehalosa, glucosa, fructosa, manitol, betaína, glicina, sodio, calcio, potasio, magnesio, combinaciones de los mismos, y etc. 60

En algunas realizaciones, el recipiente puede almacenarse a cualquier temperatura entre 0 °C y -273 °C, 65 incluyendo -1 °C, -2 °C, -3 °C, -4 °C, -5 °C, -6 °C, -7, -20 °C,..., -273 °C. El recipiente también puede enfriarse a cualquier velocidad arbitraria, incluyendo <1 °C por minuto, <5 °C por minuto, <10 °C por minutos, <20 °C por minuto, <50 °C por minuto,.....<1000 °C por minuto, etc.

ES 3 029 139 T3

En algunas realizaciones, la capacidad volumétrica del recipiente puede ser <1 microlitro, <1 ml, <5 ml, <10 ml, <15 ml, <20 ml, <25 ml, <50 ml, <100 ml, <200 ml, <300 ml, <500 ml, <750 ml, <1 L, <2 L, <3 L, <5 L, <10 L, <20 L, <50 L, <100 L, <1000 L, <10.000 L.

5 En algunas realizaciones, el producto biológico almacenado puede conservarse dentro del recipiente durante cualquier periodo de tiempo, incluyendo, pero sin limitarse a, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 5 años, 10 años, 20 años.

10 En algunas realizaciones, el recipiente puede almacenar productos biológicos de cualquier tipo o escala, incluyendo moléculas orgánicas, células, sangre, médula ósea, vasos sanguíneos, islotes pancreáticos, tejidos reproductores, piel, etc. Puede almacenar órganos completos tales como corazones, hígados, riñones, pulmones, páncreas, bazo, etc.; otros productos biológicos tales como ojos, extremidades completas o parciales, dedos de las manos o de los pies, etc.; tejidos manipulados tales como construcciones de microtejido 3D, construcciones de hígado en un chip, construcciones de pulmón en un chip, construcciones de corazón en un chip, etc.;

15 organismos completos tales como pez cebra, coral, nematodos u otros animales marinos o que habitan en la tierra; y productos alimenticios tales como cerezas, bayas, patatas, tomates, peces, carne de vaca, etc.

20 En algunas realizaciones, los productos biológicos conservados pueden perfundirse con o en el medio acuoso antes de la conservación. En otras realizaciones, los productos biológicos pueden someterse a alguna manera de acondicionamiento antes de la conservación, incluyendo perfusión normotérmica o hipotérmica en máquina, perfusión pasiva o activa con o inmersión en una solución acuosa de cualquier tipo.

25 En algunas realizaciones, el recipiente puede estar hecho de cualquier material rígido, incluyendo metales tales como acero y aleaciones del mismo, aluminio y aleaciones del mismo, titanio y aleaciones del mismo, cobre y aleaciones del mismo, etc.; materiales cerámicos; plásticos tales como acrílico, cloruro de polivinilo, polimetilmetacrilato, poliuretano, etc.; compuestos tales como polímeros reforzados con fibra de carbono (CFRP) o polímeros reforzados con fibra de vidrio (GFRP); o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el recipiente puede estar hecho de un recipiente a presión envuelto con material compuesto. En algunas realizaciones, este material puede someterse a uno o múltiples tratamientos superficiales, tales como anodización, niquelado, zincado, etc., con el fin de prevenir la corrosión, prevenir la nucleación heterogénea de hielo, mantener la biocompatibilidad, etc.

35 En algunas realizaciones, el recipiente puede hacerse hermético al aire mediante un mecanismo de sellado, que incluye juntas tóricas de caucho, juntas tóricas activadas por resorte, contacto de metal sobre metal, juntas de caucho, juntas metálicas, etc. En algunas realizaciones, el cierre del recipiente puede hacer uso de una tapa roscada, un tapón roscado, una tapa fijada, una tapa sujeta con pernos, una placa o tapón retenido mecánicamente, etc.

40 En algunas realizaciones, dentro del recipiente primario, los productos biológicos conservados también pueden almacenarse opcionalmente en un recipiente secundario, tal como una bolsa, globo, vial o tubo cubierto, u otro recipiente con al menos una superficie flexible capaz de transmitir presión hidrostática desde sus alrededores a su contenido interno. Este recipiente secundario también puede llenarse con una solución acuosa, estar completamente o en su mayor parte libre de fase gaseosa a granel, y sellarse. Esta solución acuosa secundaria puede ser la misma o diferente de la solución acuosa dentro del recipiente primario. Esta contención secundaria protegerá los productos biológicos del daño osmótico en el caso de que se forme hielo en los medios superenfriados principales (durante el periodo breve o largo que sea). En algunas realizaciones, la contención secundaria puede conservar uno o múltiples productos biológicos, y en algunas realizaciones uno o múltiples recipientes secundarios pueden ser desplegados dentro del recipiente primario.

50 En algunas realizaciones, los productos biológicos conservados dentro del recipiente también pueden recubrirse opcionalmente con o sumergirse en un hidrogel reticulado, tal como alginato sódico o ácido hialurónico reticulado con calcio u otros reticulantes iónicos, oxidativos o covalentes. Este gel reticulado protegerá los productos biológicos de posible daño osmótico durante el superenfriamiento estable o durante periodos de nucleación de hielo. Este hidrogel puede estar impregnado con una solución de conservación de órganos o cualquier otra manera de solución acuosa con el interés de mantener el equilibrio osmótico, administrar fármacos, potenciar los efectos anticongelantes, etc.

60 En algunas realizaciones, la solución dentro del recipiente puede ser opcionalmente agua de mar, y los productos biológicos conservados pueden ser opcionalmente organismos o materia marinos. En algunas realizaciones, estos productos biológicos pueden recogerse opcionalmente directamente del océano.

65 En algunas realizaciones, el recipiente, el medio acuoso o el producto biológico pueden exponerse a campos eléctricos o magnéticos. Estos campos pueden ser de naturaleza estática, oscilante o pulsada. La combinación de campos eléctricos o magnéticos con condiciones isocóricas puede mejorar aún más la estabilidad de superenfriamiento en los medios acuosos cerrados.

En algunas realizaciones, el recipiente puede fabricarse de un material rígido transparente. Este recipiente puede usarse opcionalmente para estudiar o monitorizar el contenido interno o comportamientos del recipiente, incluyendo, pero sin limitarse al comportamiento de productos biológicos conservados o de transiciones de fase que pueden producirse durante una desestabilización o evento de nucleación de hielo. En algunas realizaciones, el recipiente puede integrarse en una plataforma de microscopio, permitiendo el examen microscópico del contenido en su interior. En algunas realizaciones, el recipiente puede construirse con geometrías a escala de milímetros o micrómetros de longitud para estos fines.

En algunas realizaciones, los recipientes pueden construirse a escala de milímetros o micrómetros de longitud para cualquier propósito, incluyendo, pero sin limitarse a la conservación de células individuales o grupos de células, enfriamiento rápido para los propósitos de mantener el superenfriamiento hasta la temperatura de transición vítrea del medio acuoso, estudio de propiedades termofísicas o efectos a microescala en condiciones isocóricas, etc.

Además, la invención también es útil para proporcionar entornos acuosos que permanecen líquidos a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, y por tanto pueden usarse para facilitar reacciones químicas controladas por temperatura, polimerización, gelificación u otros procesos térmicos o químicos. La invención también puede usarse para controlar el superenfriamiento de metales o semiconductores líquidos con fines eventuales de cristalización controlada.

Ejemplos

La invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1: análisis teórico de factores termodinámicos y cinéticos que restringen la nucleación y el crecimiento de hielo en sistemas isocóricos

Sin limitarse a la teoría, se introducirá en este caso un análisis teórico conceptual de sistemas termodinámicos superenfriados en condiciones isocóricas e isobáricas convencionales. Esta sección teórica se incluye únicamente para mayor claridad y exhaustividad.

Formulación termodinámica de la transición de fase agua-hielo en diferentes condiciones

Las transiciones de fase del agua se describen generalmente usando variables naturales de temperatura y presión, que corresponden al potencial termodinámico de Gibbs $G(T, P)$. Se considera la congelación del agua pura en un recipiente indeformable (es decir, a volumen constante). El agua se expande al congelar hasta hielo-1h, y si el recipiente tiene un volumen específico menor que el del hielo-1h, el contenido del sistema nunca podrá congelarse completamente, dando como resultado un equilibrio bifásico agua-hielo. El diagrama de fase T-P estándar para agua pura incluye solo regiones monofásicas, por lo que este equilibrio bifásico anticipado de agua y hielo en condiciones isocóricas no puede cuantificarse de manera directa a partir del diagrama de fase de agua tradicional. Al retener la presión como variable natural, se fuerza a analizar este equilibrio bifásico como ocurriendo entre dos entidades distintas, el hielo y el agua, y se debe resolver el equilibrio mecánico equilibrando los módulos de volumen de las fases sólida y líquida contra la presión hidrostática que surge a medida que se forma y se expande el hielo [21]. Aunque los estados de equilibrio del sistema pueden predecirse de hecho usando este enfoque, la formulación matemática resulta incómoda, y debe volver a resolverse continuamente a medida que se alteran la temperatura y la presión.

Aunque el potencial de Gibbs es apropiado en la mayoría de contextos físicos, es sólo una de las muchas transformadas de Legendre posibles de la energía interna, $U(S,V)$. Si surge una situación en donde la energía libre de Gibbs deja de ser conveniente, debe reemplazarse en favor de un potencial más adecuado. Para el caso de congelación en condiciones isocóricas, un enfoque termodinámico más elegante es intercambiar presión como una variable natural en favor del volumen, aprovechando de este modo el potencial termodinámico de Helmholtz para este análisis. En esta descripción, las condiciones límite termodinámicas se vuelven a enmarcar alrededor del recipiente contenedor, describiendo todo el sistema de agua-hielo bifásico a la vez.

En el presente documento se usa la energía libre de Helmholtz para derivar los comportamientos de fase de equilibrio del agua mantenida en un sistema de volumen constante a temperaturas bajo cero. Esta derivación produce el diagrama de fase T-V para agua y hielo, caracterizado por una zona prominente de equilibrio bifásico, análoga a la encontrada en los diagramas de fase eutéctica binaria. También se deriva una teoría clásica de nucleación para hielo en condiciones isocóricas, que revela diferencias fundamentales entre la cinética de congelación bajo volumen constante frente a presión constante. En los sistemas isocóricos, se revela que la barrera energética a la nucleación es mayor, y que existe un umbral de volumen absoluto crítico (del orden de micrómetros), bajo el cual la nucleación de un único núcleo de hielo se prohíbe cinéticamente. Los presentes análisis proporcionan en este caso una base clásica a partir de la cual analizar la termodinámica y cinética de congelación en sistemas isocóricos; establecer contexto para interpretar la fenomenología del

agua y el hielo en estas importantes condiciones límite.

Construcción de un diagrama de fase T-V que usa la energía libre de Helmholtz

- 5 Los diagramas de fase se construyen mediante una proyección de las fases de energía libre más bajas sobre ejes de las variables termodinámicas naturales. La elección de las variables naturales rige la geometría de las superficies de energía libre y, por lo tanto, el comportamiento de coexistencia de fases en el diagrama de fases resultante.
- 10 Para que una sustancia monofásica homogénea sea estable, su superficie de energía interna, U, debe ser definida como positiva; $\partial^2 U / \partial X^2 > 0$, donde X son las variables termodinámicas amplias $X = S, V, N$, etc. Cuando no es conveniente usar una variable natural extensa, se puede construir un nuevo potencial termodinámico con variables naturales intensivas, $Y = T, P, \mu$, etc., mediante una transformación de Legendre de la variable extensa con respecto a su conjugado intensivo, $U - (\partial U / \partial X)X = U - XY$ [22]. Después de una transformación de
- 15 Legendre, la curvatura de la superficie de energía libre se vuelve cóncava hacia abajo en la(s) variable(s) termodinámica(s) intensiva(s) correspondiente(s) [23], o retiene de otro modo la curvatura convexa hacia arriba de U en la(s) variable(s) extensa(s) [24].

20 El potencial de Gibbs tiene variables naturales intensivas de temperatura y presión y, por lo tanto, las superficies de energía libre de Gibbs son cóncavas hacia abajo en ambas T y P. La proyección de la fase de energía libre de Gibbs más baja sobre los ejes de temperatura y presión recupera el diagrama de fase T-P estándar, como se muestra para H₂O en la Figura 4A, construido usando datos termodinámicos de la Asociación Internacional para las Propiedades del Agua y Vapor (IAPWS) [25,26]. Para un sistema de un solo componente como H₂O, la coexistencia de fase se rige por la intersección de estas superficies cóncavas hacia abajo de energía libre,

25 dando como resultado una línea de coexistencia de fase de 1 dimensión en el plano T-P.

En un sistema isocórico, sin embargo, las variables naturales deben ser la temperatura y el volumen, en lugar de la presión, que corresponde al potencial termodinámico de Helmholtz, F. Se puede construir F(T, V) para

30 agua y hielo-1 h mediante una transformada de Legendre de los datos de energía libre de Gibbs como:

$$F(T, V) = G(T, P(V)) - PV$$

Debido a que V es extensa y T es intensa, F es convexa hacia arriba en volumen y cóncava hacia abajo en

35 temperatura.

La convexidad de la energía libre de Helmholtz en función del volumen cambia fundamentalmente la naturaleza de la coexistencia de fases en el mismo espacio T-V. La envolvente de energía libre más baja incluye ahora líneas tangentes entre las curvas F_{agua}(V) y F_{hielo}(V) convexas, que significan una región de equilibrio bifásico

40 2D, en contraposición a una línea de coexistencia de fases 1D. Gibbs denominó estas líneas tangentes "líneas de energía disipada" [27], a lo largo de las cuales una sustancia homogénea monofásica puede reducir su energía libre formando una mezcla heterogénea de dos fases. Estas líneas tangentes son análogas a las usadas en la construcción de casco convexo de diagramas de fase eutéctica binaria, que se construyen a partir de la energía libre de Gibbs, G(T,x)[28]. La construcción de casco convexo puede aplicarse tanto a G(x) como

45 a F(V) porque tanto la composición como el volumen son variables extensas y, por lo tanto, sus superficies de energía libre son convexas.

Proyectando el casco convexo de menor energía formado por las superficies F_{agua} y F_{hielo} en la Fig. 4B, se construyen los diagramas de fase T-V para el agua, mostrados en la Fig. 4C. Según nuestro conocimiento, este

50 diagrama de fases no ha sido reportado previamente en la literatura. El diagrama de fase T-V del agua presenta una región de equilibrio de dos fases, en donde la fracción de fase de equilibrio puede resolverse usando la regla de Lever, de la misma manera empleada para los diagramas de fase eutéctica binaria T-x [28]. Para referencia del lector, la fracción de fase en función de la temperatura y el volumen específico del sistema se muestra en la Figura 4D.

55 A una temperatura dada, la pendiente de estas líneas tangentes, $(\partial F / \partial V)_T$ proporciona la presión que ejerce la mezcla bifásica sobre el recipiente de volumen constante. Se marcan estas isoclinas de presión sobre el diagrama de fase T-V en la Figura 4C. Obsérvese que, en la región de equilibrio bifásica, las líneas tangentes conectan las curvas de agua y hielo-1h de energía libre, lo que implica que el agua y el hielo experimentan la misma presión, que es de hecho un requisito para el equilibrio mecánico.

60

La cinética de nucleación de hielo en sistemas isocóricos: motivaciones físicas

65 El diagrama de fase T-V en equilibrio producido en la Fig. 4C depende del volumen específico, ya que las regiones de coexistencia de fases definen el equilibrio termodinámico independientemente de la cantidad de material presente. A continuación, se muestra que la cinética de nucleación en sistemas isocóricos depende

adicionalmente del volumen absoluto del recipiente del sistema, y se aprovechan ambas dependencias para derivar una nueva teoría isocórica de nucleación. Se considera el proceso de congelación isocórica, en donde un recipiente cerrado de volumen fijo lleno de agua pura se lleva por debajo de 0 °C a un estado superenfriado metaestable. Antes de los nucleados de hielo, el agua superenfriada experimentará cierta presión P_1 que viene dada por la pendiente de la línea tangente $\partial F_{\text{agua}}/\partial v$ en el volumen específico del recipiente, como se marca en la Figura 5. Cuando se nuclea hielo-1h, el núcleo naciente ejercerá una presión adicional sobre el agua y el recipiente, y debido a que el volumen total del sistema no puede cambiar, el recipiente ejercerá una presión igual y opuesta de vuelta tanto sobre el agua como sobre el núcleo del hielo. Esto reduce el volumen específico de hielo y agua, y aumenta su energía libre específica según las curvas $F(v)$ mostradas en la Fig. 5. Se denomina la energía necesaria para esta presurización del sistema y densificación de la fase líquida inicial la "penalización por crecimiento isocórico", que puede interpretarse como una penalización energética que la fase sólida debe pagar para crecer dentro de un sistema de volumen absoluto y específico constreñido.

Intuitivamente, la magnitud de esta penalización debe variar con el volumen absoluto del sistema; el crecimiento de un único núcleo de hielo confinado en un océano no producirá ningún efecto apreciable, pero el crecimiento del mismo núcleo en un recipiente a nanoescala puede comprimir el agua restante significativamente.

La presión dentro del sistema es por lo tanto una función de la fracción de fase relativa de hielo que ha crecido. Debido a que el agua y el hielo permanecen en equilibrio mecánico constante, la presión experimentada por ambas fases será igual. Se recuerda que la presión dentro de una fase dada a un volumen específico dado se describe por la pendiente de la línea tangente a su curva $F(v)$ en ese volumen, esta restricción física puede ser ilustrada por una "construcción tangente paralela" como se muestra en la Fig. 5, por lo que los volúmenes y energías específicos de cada fase para una fracción de fase dada de hielo son identificados por los puntos en las curvas $F(v)$ para el agua y el hielo que producen tangentes paralelas entre las fases.

El uso de esta construcción tangente paralela para seguir la continuidad de presión entre fases es análogo a la construcción tangente usada originalmente por Gibbs para describir la continuidad del potencial químico entre fases en sistemas binarios a temperatura y presión constantes [1]. Durante el crecimiento del hielo en un sistema isocórico (y la densificación concomitante de ambas fases), las líneas tangentes permanecerán paralelas mientras aumentan gradualmente en pendiente hasta que las dos líneas se fusionen y formen la tangente común, lo que marca el estado de equilibrio bifásico mostrado en la Figura 4 y proporciona la presión de equilibrio $P_{\text{equilibrio}}$

Formulación matemática del sistema

En la sección anterior, se estableció que en un sistema isocórico, las energías libres específicas del agua y el hielo no permanecen constantes durante el proceso de nucleación y crecimiento, sino que se desplazan dinámicamente a lo largo de sus respectivas curvas $F(v)|_{\tau}$ según la construcción tangente paralela. Para describir matemáticamente este comportamiento, se necesita una expresión que relaciona los volúmenes específicos (y por lo tanto las energías libres) de las fases en función del crecimiento del núcleo de hielo.

Dado un sistema isocórico cerrado, la masa y el volumen deben ser conservados

$$m_{\text{sistema}} = m_{\text{hielo}} + m_{\text{agua}} \quad (1)$$

$$V_{\text{sistema}} = V_{\text{hielo}} + V_{\text{agua}} \quad (2)$$

lo que implica además la conservación de un volumen específico. Sin embargo, se observa que la conservación del volumen específico no toma la forma $v_{\text{sistema}} = v_{\text{hielo}} + v_{\text{agua}}$ como se podría esperar, debido a que el volumen específico del sistema no es en sí mismo una cantidad inherentemente conservada; en cambio, se conserva como una simple consecuencia matemática de la conservación de la masa y el volumen del sistema, y se da por tanto por definición como:

$$v_{\text{sistema}} \equiv \frac{V_{\text{sistema}}}{m_{\text{sistema}}} \equiv \frac{V_{\text{hielo}} + V_{\text{agua}}}{m_{\text{hielo}} + m_{\text{agua}}} \quad (3)$$

El requisito de igual presión en todo el sistema proporciona la restricción final. Al aprovechar la lógica tangente paralela, las presiones del hielo y el agua durante el proceso de nucleación sin equilibrio pueden seguirse a lo largo de las curvas $F - v$ por sus derivadas:

$$-\left(\frac{dF_{\text{agua}}}{dv}\right)_{v_{\text{agua}}} = -\left(\frac{dF_{\text{hielo}}}{dv}\right)_{v_{\text{hielo}}} \quad (4)$$

En la información de apoyo, se utilizan estas cuatro restricciones para determinar los volúmenes específicos de cada fase en función del volumen del núcleo ($v_{\text{agua}}(V_{\text{hielo}})$, $v_{\text{agua}}(V_{\text{hielo}})$) a lo largo de la coordenada de reacción del proceso de nucleación. Estos volúmenes específicos proporcionan de este modo la energía libre específica tanto para agua como para hielo,

$F_{\text{agua}}(v_{\text{agua}}(V_{\text{hielo}}))$, $F_{\text{hielo}}(v_{\text{hielo}}(V_{\text{hielo}}))$ en función del volumen del núcleo de hielo, que permite la derivación de la barrera de nucleación.

Derivación de una barrera de nucleación isocórica

Se considera ahora dos estados que el sistema isocórico puede ocupar (Fig. 5). Para mayor claridad, se describirá la energía libre total del sistema con la variable Φ , y las energías libres de Helmholtz específicas de cada fase como F_{agua} y F_{hielo} . Los subíndices 1 y 2 se usarán para indicar los valores de los parámetros en los estados 1 y 2.

En el estado 1, todo el sistema está en fase líquida, y su energía libre viene dada por tanto por:

$$\Phi_1 = F_{\text{agua}1} m_{\text{sistema}} \quad (5)$$

en donde $F_{\text{agua}1} = F_{\text{agua}}(v_{\text{agua}1} = v_{\text{sistema}})$. En el estado 2, un núcleo de hielo-1h de volumen absoluto V_{hielo} se ha formado, dividiendo el sistema en dos fases con volúmenes específicos $v_{\text{agua}}(V_{\text{hielo}})$ y $v_{\text{hielo}}(V_{\text{hielo}})$. Definiendo la fracción de fase de hielo del sistema como:

$$f = \frac{m_{\text{hielo}}}{m_{\text{sistema}}} = \frac{V_{\text{hielo}} v_{\text{sistema}}}{v_{\text{hielo}} V_{\text{sistema}}} \quad (6)$$

e incorporando un término de energía libre interfase estándar y que se escala con el área superficial del núcleo de hielo A_{hielo} , la energía libre total del estado 2 viene dada por:

$$\Phi_2 = \Phi_1 + \Delta\Phi = [F_{\text{agua}2} \times (1-f) + F_{\text{hielo}2} \times f] m_{\text{sistema}} + \gamma A_{\text{hielo}} \quad (7)$$

en donde $F_{\text{agua}2} = F_{\text{agua}}(v_{\text{agua}2} = v_{\text{agua}}(V_{\text{hielo}}))$ y $F_{\text{hielo}2} = F_{\text{hielo}}(v_{\text{hielo}2} = v_{\text{hielo}}(V_{\text{hielo}}))$. La redistribución de estas ecuaciones y la agrupación de términos de energía libre específicos por fase, el cambio de energía libre $\Delta\Phi$ tras la formación de un núcleo se da mediante:

$$\Delta\Phi = \Phi_2 - \Phi_1 = [(F_{\text{agua}2} - F_{\text{agua}1}) + (F_{\text{hielo}2} - F_{\text{agua}2}) f] m_{\text{sistema}} + \gamma A_{\text{hielo}} \quad (8)$$

Los dos términos de diferencia de energía en la ecuación (8) tienen una significación física clara y significativa. $(F_{\text{agua}2} - F_{\text{agua}1})$ describe la "penalización isocórica de crecimiento", o la energía necesaria para presurizar el sistema y densificar la fase acuosa que debe proporcionar el núcleo de hielo emergente para crecer. Este término siempre será positivo. $(F_{\text{hielo}2} - F_{\text{agua}2})$ que siempre será negativo, da la diferencia de energía libre a granel entre las fases en sus volúmenes específicos presentes, que se pondera por la fracción de fase f con el fin de captar la naturaleza bifásica del sistema de equilibrio.

El cambio de energía libre que acompaña a la formación de un núcleo de hielo en un sistema isocórico puede reducirse así a lo siguiente:

$$\Delta\Phi = [\Delta F_{\text{crecimiento isocórico}} + \Delta F_{\text{a granel}} f] m_{\text{sistema}} + \gamma A_{\text{hielo}} \quad (9)$$

Los términos energía libre a granel e interfacial en la ecuación (9) son aproximadamente análogos a los encontrados en la teoría clásica de nucleación; el primero se escalará con el área superficial del núcleo en la dirección positiva, el segundo con su volumen o masa en la negativa. Sin embargo, es crucial observar que dentro de la formulación de Gibbs, se considera la diferencia de energía libre en a granel agua y hielo constante, mientras que en un sistema isocórico, varía en función de la fracción de la fase de hielo, disminuyendo en magnitud a medida que el hielo crece en un reflejo del hecho de que el destino termodinámico final del sistema es un estado de equilibrio agua-hielo bifásico, no congelación completa.

El término de penalización de crecimiento isocórico es único para sistemas de volumen restringido, y se mostrará a continuación para alterar fundamentalmente el comportamiento de nucleación.

Resultados

En la Figura 6A, se traza el cambio de energía libre total $A\Phi$ junto con las tres contribuciones de energía separadas; la energía interfacial, la energía a granel y la penalización de crecimiento isocórico. Los presentes cálculos para la Figura 6A describen un único núcleo de hielo-1h de geometría esférica en un sistema de volumen absoluto $V_s \sim 2 \times 10^{-22} \text{m}^3$ a una temperatura de -4.15°C (parámetros adicionales disponibles en SI).

La Figura 6B presenta curvas ΔG adicionales para la misma temperatura pero variando los volúmenes absolutos del sistema V_s . Estas gráficas revelan una diferencia fundamental entre la formación de hielo a volumen constante y la formación de hielo a presión constante: en la formulación clásica de Gibbs, la curva ΔG (radio) presenta un punto crítico, mientras que en un sistema isocórico hay dos puntos críticos.

Clásicamente, el punto crítico de la curva de energía libre es un máximo y define la barrera de nucleación, o la barrera energética después de la cual el crecimiento continuado del hielo reducirá indefinidamente la energía libre del sistema hasta que la totalidad haya cambiado de fase. En el caso isocórico, sin embargo, el crecimiento del hielo no es indefinido, debe cesar al alcanzar la fracción de fase de equilibrio, según el diagrama de fase T-V (Fig. 4C/D). Esta limitación se capta cinéticamente por el término de crecimiento isocórico y, por lo tanto, las curvas ΔG pueden poseer dos puntos críticos; el primero un máximo en donde la fuerza de accionamiento a granel para la transición de fase supera la penalización de formar una nueva superficie de contacto de fase, y el segundo un mínimo en donde la energía de crecimiento isocórico supera la fuerza de accionamiento a granel.

Es importante que, debido a que el término de crecimiento isocórico es una función del volumen absoluto del sistema (escalamiento como $V_{\text{hielo}}/V_{\text{sis}}$), su contribución desaparece en el límite de volumen infinito, coherente con la intuición. En este caso, que se denomina límite de Gibbs en la Figura 6B, la curva de energía libre de ΔG será idéntica a la encontrada usando la formulación de Gibbs clásica, que presenta solo un máximo inicial.

Por el contrario, a medida que el volumen del sistema disminuye, aumenta la contribución relativa del término de crecimiento isocórico, tanto introduciendo el segundo punto crítico (correspondiente a la limitación de la fracción de fase) como aumentando el radio crítico de la barrera de nucleación. Este aumento se capta en la Fig. 6C, proporcionada en función del volumen absoluto del sistema para diversas temperaturas de subcongelación. Obsérvese que a temperaturas cercanas al punto de congelación, el efecto de la restricción de volumen en la nucleación isocórica puede ser significativo incluso bajo volúmenes de sistema relativamente grandes, del orden de micrómetros.

La presente derivación revela además la existencia de un volumen absoluto discreto del sistema, que se denomina volumen crítico de confinamiento, por debajo del cual el segundo punto crítico alcanzará una energía igual al primero, borrando el punto de inflexión entre ellos y produciendo una curva de energía libre de núcleo que aumenta monótonamente con el radio. Una curva de energía libre representativa en este umbral de volumen absoluto se denomina límite de Helmholtz en la Fig. 6B. Estos volúmenes críticos de confinamiento también están marcados en las curvas de radio crítico en la Fig. 6C, indicando el volumen del sistema en donde el radio crítico para la nucleación se haría infinito. Estos volúmenes críticos del sistema se representan entonces independientemente frente a la temperatura en la Fig. 6D, dando como resultado un "diagrama de fase cinética" para congelar agua bajo volúmenes confinados. El presente diagrama cinético de fases revela una implicación única para sistemas de volumen constante: existe un régimen volumétrico en donde la nucleación de hielo-1h desde el estado líquido superenfriado es cinéticamente imposible.

Notablemente, la existencia de hielo dentro de este régimen no está prohibida termodinámicamente, comparando la Fig. 6C con la Fig. 4D puede verse que estos volúmenes críticos del núcleo de hielo son órdenes de magnitud más pequeños que el límite de fracción de fase de equilibrio. Estos resultados indican que el hielo podría teóricamente existir en estos volúmenes del sistema (por ejemplo, si se siembra artificialmente un cristal de hielo en el sistema y el volumen se constriñe entonces), pero esa agua superenfriada simplemente no tiene ruta cinética para congelarse en un sistema isocórico suficientemente confinado.

Análisis

El análisis cinético proporcionado en el presente documento solo describe la formación de solo el primer núcleo de hielo-1h en un recipiente infinitamente rígido (por ejemplo, un recipiente de volumen realmente constante), y está sujeto a suposiciones de simplificación adicionales, incluyendo la suposición de núcleos esféricos y de energía interfacial conocida. Sin embargo, las ideas reveladas proporcionan las bases conceptuales para una amplia gama de estudios adicionales, y resumen los comportamientos energéticos limitantes de los núcleos de hielo en sistemas isocóricos. Se anticipa que en sistemas que se desvían de las condiciones descritas en el presente documento, la cinética de nucleación de hielo se encontrará en algún lugar entre los límites de Gibbs y Helmholtz identificados. Por ejemplo, los sistemas de volumen a nanoescala encontrados en materia biológica pueden experimentar una penalización de crecimiento isocórico reducida debido a algún grado de flexibilidad dentro del recipiente, pero el exceso de energía requerido para crecer en un volumen restringido sigue siendo

una característica físicamente pertinente. Por el contrario, dentro de los recipientes rígidos descritos en esta invención, la suposición de rigidez infinita es probablemente aceptable, pero los volúmenes macroscópicos son demasiado grandes para apreciar el efecto de un único núcleo de hielo. Sin embargo, permanece la continuidad de la presión dentro del sistema, forzando a cada núcleo en crecimiento a interactuar entre sí a través de la presión, y por lo tanto aún se observará un efecto macroscópico en la cinética de nucleación. Esto tiene implicaciones útiles, tales como superenfriamiento potenciado o de alta estabilidad debido a barreras de nucleación elevadas, y debe estudiarse en el futuro análisis a nivel de conjunto construido a partir de la teoría de nucleación isocórica de un único núcleo. En resumen, independientemente de los detalles experimentales del sistema, si está operando en condiciones de volumen constante, la ecuación de barrera de nucleación presentará un término de crecimiento isocórico positivo, aumentando la barrera energética que debe cruzarse para hacer crecer una fase de hielo a granel y disminuyendo la probabilidad de nucleación inicial.

Ejemplo 2. Demostración experimental de superenfriamiento isocórico de estabilidad ultraalta

En este ejemplo, se encuentra que las condiciones y cámaras isocóricas pueden mejorar significativamente la estabilidad a largo plazo y la capacidad para resistir la perturbación de una solución superenfriada, sobre otras técnicas para mantener el superenfriamiento.

En este ejemplo, se superenfrió agua desionizada en cámaras rígidas idénticas en tres conjuntos de condiciones:

1. Condiciones isobáricas estándar, en donde las cámaras se llenaron hasta aproximadamente un 95 % de volumen y se taparon, dejando una capa de aire que, dada su extrema compresibilidad, funciona como un depósito de presión atmosférica eficaz.

2. Condiciones isobáricas selladas con aceite, en donde las cámaras se llenaron de manera similar pero luego se sellaron con una capa de 2 mm de aceite mineral antes de tapar, eliminando completamente la superficie de contacto aire-agua [7].

3. Condiciones isocóricas principalmente libres de aire, en donde las cámaras se ensamblaron utilizando una simple modificación de tapa que permitió el llenado y sellado de los frascos sin la introducción de aire o cavidades (detalles en los métodos a continuación) dejando un volumen de líquido totalmente restringido incapaz de ninguna manera de flujo visible cuando se le da la vuelta.

Todos los sistemas se superenfriaron inicialmente a -3 ± 0.01 °C en un baño circulante a temperatura constante y después se expusieron a diversas perturbaciones macroscópicas, incluyendo impacto de caída desde una altura de 30,48 cm (1 pie) sobre una superficie acrílica dura, carga vibratoria de 2.2 g en una mesa de agitación rotatoria, ultrasonificación en un baño enfriado a 55 kHz y ciclado térmico continuo entre 0 y -6°C durante 24 horas (detalles experimentales disponibles en los métodos a continuación). La nucleación se evaluó visualmente, y la frecuencia de nucleación se registró como el número de cámaras por grupo que experimentaron formación de hielo. Todos los ensayos se realizaron en $n = 6$ ensayos de $N = 12$ cámaras, y se repitieron en dos tamaños (75 ml y 125 ml) de botellas de medios de vidrio de borosilicato con tapones de polipropileno rígidos roscados. Para garantizar la relevancia de estos ensayos para los protocolos de conservación de interés, que implican invariablemente la introducción de otros posibles sitios de nucleación en el sistema, también se añadió un chip de PDMS en vidrio a cada recipiente, representativo de los sistemas de laboratorio en un chip usados para alojar construcciones de tejido diseñadas [29].

Métodos

Preparación de la cámara - se llenaron cámaras isobáricas hasta un volumen de aproximadamente el 95% con agua desionizada y se taparon, dejando una capa de aire de aproximadamente 2 cm de altura encima del líquido. Se llenaron cámaras isobáricas selladas con aceite al mismo nivel, luego se sellaron mediante una jeringa con una capa de aceite mineral (Sigma-Aldrich, EE.UU.) de aproximadamente 2 mm de altura. Según el protocolo descrito en estudios anteriores [7] se tomó para asegurar que se eliminaba toda la interfase agua-aire. Para el montaje de cámaras isocóricas, se colocó a presión un tapón de caucho de aproximadamente 1.5 ml de volumen en la tapa de cada cámara, con el fin de desplazar el volumen a medida que la tapa se giraba sobre las roscas de la cámara y asegurar que no quedaba aire al sellar el sistema. Después del sellado, las cámaras isocóricas se voltearon y agitaron para verificar visualmente que no quedaba aire presente en el sistema. En los tres casos de ensamblaje, el agua DI se enfrió a 4 °C antes del llenado, y la cámara se sometió a ultrasonidos después del vertido inicial para eliminar cualquier burbuja de aire atrapada. También se añadió un chip de PDMS sobre vidrio de 3 x 1.5 x 1.5 cm a cada sistema para garantizar que los efectos observados no fueran productos de los recipientes específicos que se emplearon.

Perturbaciones mecánicas

Para todos los escenarios de perturbaciones no térmicas, las cámaras se superenfriaron primero a -3 ± 0.01

°C en un baño enfriador circulante programable a temperatura constante (PolyScience, EE.UU.) durante cuatro horas. A continuación, se retiraron e inmediatamente se expusieron a una de las siguientes perturbaciones.

5 Impacto: las cámaras se dejaron caer desde una altura de 30,48 cm (un pie) sobre una placa acrílica dura de 0.5" de grosor. Como en el esquema de la Figura 2A, se usó un tubo acrílico transparente de diámetro ligeramente mayor que las cámaras para asegurar una trayectoria de gota recta y repetible.

10 Vibración: las cámaras se montaron en una mesa de agitación rotatoria cubierta (ThermoFisher, EE.UU.) y se agitaron durante 60 segundos a una velocidad de 500 rpm y un radio rotatorio de 8 mm, produciendo magnitudes de aceleración de aproximadamente 2.2 g. Las cámaras se montaron en un bastidor de espuma aislante, y la atmósfera dentro de la mesa de agitación cubierta se mantuvo a -3 ± 0.5 °C mediante circulación de vapor de CO₂ frío. Durante el diseño experimental inicial, la temperatura dentro de las cámaras se confirmó mediante termopar para que permaneciera consistente dentro de 0.1 °C durante el período de agitación de 60 segundos.

15 Ultrasonicación: las cámaras se movieron directamente desde el enfriador circulante a un baño ultrasónico (Fisher Scientific, EE.UU.), se sumergieron completamente y se sonicaron a 55 kHz durante 30 segundos. El baño se llenó con solución de NaCl al 10 % p/v enfriada previamente a -3 °C para garantizar la consistencia de la temperatura.

20 Perturbaciones térmicas

25 Las cámaras se sumergieron completamente en el baño a -3 °C directamente después del montaje. El baño de enfriamiento se programó entonces para que se elevara continuamente entre 0 °C y -6 °C en un período de una hora durante 24 horas (que constituye doce ciclos entre las dos temperaturas), manteniendo una temperatura promedio de -3 °C. Este intervalo se eligió para reflejar la oscilación de temperatura encontrada en las unidades de refrigeración por compresión de vapor de encendido/apagado estándar. Después de 24 horas, las cámaras se retiraron cuidadosamente y se evaluaron para determinar la nucleación de hielo.

30 En todos los escenarios de perturbación, la nucleación de hielo se evaluó visualmente, como se muestra en la Fig. 2B, y se registró como un paso/fallo binario con el propósito de calcular la frecuencia de nucleación.

Examen de las interfases fluido-fluido bajo vibración

35 Para permitir la fotocaptación clara de los comportamientos de interfaces mostrados en la Figura 4, se usaron recipientes alternativos hechos de poliestireno virgen ópticamente claro con un perfil rectilíneo (matraz de cultivo celular T75, ThermoFisher, EE.UU.). Se añadieron 45 ml de agua DI a cada recipiente, evitando cuidadosamente las burbujas de aire durante el llenado. A continuación se añadieron 10 ml de aceite mineral a un recipiente, sellando completamente la superficie libre del agua. Las dos cámaras se sometieron a vibración en un mezclador de vórtice de acción vertical (ThermoFisher, EE.UU.) y se captó el vídeo del comportamiento de la interfase a una resolución de 1080 p y una velocidad de 30 fotogramas por segundo en una cámara Nikon D3400.

40 Análisis estadístico

45 Cada grupo experimental, definido como las cámaras expuestas a una perturbación dada (por ejemplo, impacto, vibración, ultrasonicación, térmica) a un volumen de recipiente dado (por ejemplo, 75 o 125) en una condición de carga dada (por ejemplo, isobárica, isobárica sellado con aceite o isocórica), estaba compuesto por 72 cámaras divididas en $n = 6$ grupos de $N = 12$ cámaras. Los valores representados en los resultados representan medias, mientras que las barras de error representan desviaciones estándar. Se evaluaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos usando pruebas t de muestras emparejadas calculadas usando MATLAB, con un umbral de significación convencional de $P < 0,05$.

50 Resultados experimentales

55 La frecuencia de nucleación en función del tipo de perturbación se representa gráficamente para las tres configuraciones de cámara en la Fig. 5A, y las comparaciones entre configuraciones de cámara para cada tipo de perturbación se presentan individualmente en la figura 5B-E para evaluación estadística. Como se demuestra en la Fig. 5A, las condiciones isocóricas proporcionan una estabilidad de superenfriamiento enormemente mejorada en todos los tipos de perturbación, en ambas escalas de volumen. Notablemente, el superenfriamiento isocórico a un volumen de 75 ml permaneció estable en aproximadamente el 90 % de los ensayos cuando se expuso a ultrasonicación, que es el desencadenante más universal y de llama segura de la nucleación de hielo actualmente conocido [3,5,30], y permaneció estable en todos los ensayos cuando se expuso a carga vibratoria comparable a la encontrada durante el vuelo comercial. Según el mejor conocimiento de los inventores, nunca se ha presentado ninguna tecnología que pretenda ser capaz de resistir la nucleación inducida por ultrasonidos en agua pura, o de demostrar este grado de estabilidad a volúmenes a granel a través de una amplia gama de tipos de perturbación. Este hallazgo demuestra un grado extremo de estabilidad y proporciona prueba a la presente reivindicación de que las condiciones isocóricas permiten superenfriamiento

de alta estabilidad. Las condiciones isobáricas estándar proporcionaron la menor estabilidad en comparación, mientras que el sellado con aceite proporcionó mejoras de estabilidad estadísticamente significativas con respecto a las condiciones isobáricas estándar durante la exposición a carga vibratoria macroscópica e impacto agudo, pero no afectó significativamente la resistencia a la perturbación ultrasónica o térmica. En conjunto, como se demuestra en la Figura 5A, el superenfriamiento isocórico proporciona una estabilidad drásticamente mejorada en comparación con otros métodos.

Análisis

Se sabe desde hace tiempo que los estímulos mecánicos inducen la nucleación de hielo [2], y el último siglo de investigación sobre el tema ha aclarado que la cavitación es el mecanismo responsable más prominente [4,5,8,9]. Aunque la cavitación está frecuentemente asociada con la ultrasonificación, también está causada por todo tipo de ondas de choque [31] y por efectos de superficie de vibración tales como la inestabilidad de Faraday [32], que se producen en superficies de contacto fluido-fluido a granel.

Los presentes resultados en este estudio demuestran que el superenfriamiento isocórico es significativamente más estable que sus homólogos isobáricos cuando se exponen a estímulos mecánicos de cualquier tipo, y por tanto se sugiere, sin desear estar limitados teóricamente, que un mecanismo fundamental que impulsa esta estabilidad isocórica es una probabilidad reducida de cavitación. Al restringir totalmente el volumen de líquido, las condiciones isocóricas eliminan las oportunidades de cavitación de los efectos que requieren superficies de contacto fluido-fluido a granel (tales como la inestabilidad de Faraday o efectos análogos), y eliminan las oportunidades de cavitación del movimiento a granel del agua almacenada. Además, presentan dos obstáculos termodinámicos a la cavitación de ondas de choque o ultrasonificación: en primer lugar, debido a que no hay aire a granel en ningún lugar en el sistema, debe producirse cavitación en aire disuelto que se fuerza primero fuera de la solución con el agua superenfriada; en segundo lugar, la formación de una burbuja de aire de baja densidad en un volumen limitado de agua creará una presión positiva, aumentando su barrera energética a la formación. Aunque el análisis teórico de este último efecto está fuera del alcance de este trabajo, es directamente análogo en concepto a las barreras energéticas aumentadas producidas por la formación de hielo en un volumen restringido (como se describe en el ejemplo 1).

En total, la estabilidad de superenfriamiento superior experimentada en los sistemas isocóricos es un efecto compuesto, que refleja los complejos factores termodinámicos y cinéticos que impulsan la nucleación de hielo en sistemas de volumen a granel.

Los factores termodinámicos tales como la reducción o eliminación de fluctuaciones de densidad microscópica y el aumento de la barrera de nucleación de hielo en condiciones isocóricas contribuyen [33, ejemplo 1]; la eliminación de todas las interfases fluido-fluido contribuye [7]; y una resistencia global aumentada a la cavitación juega un papel central. La realidad experimental de superenfriamiento de alta estabilidad mejorado en condiciones isocóricas puede emplearse inmediatamente para la conservación y transporte de bajo riesgo de materia biológica sensible.

Ejemplo 3: diseño de recipiente base para dispositivos de superenfriamiento isocóricos

En algunas realizaciones del sistema mostrado esquemáticamente en la Fig. 2 (no según la invención), el recipiente de volumen constante base usado para lograr superenfriamiento isocórico de alta estabilidad puede diseñarse como se detalla en los dibujos de ingeniería caracterizados en las Figuras 8-11. También puede diseñarse de cualquier otra manera arbitraria para garantizar la contención rígida del líquido en su interior y un sellado de aire eficaz.

Este diseño hace uso de un cierre de cubierta y tapón de dos partes para asegurar un sellado robusto de la junta tórica y una transmisión opcional efectiva de la presión hidrostática a un transductor de presión que puede conectarse a través de una de las conexiones roscadas de alta presión 9/16-18-UNF.

A través del orificio de conexión roscado posterior secundario pueden pasar instrumentos de monitorización de la temperatura, instrumentos para la medición de las propiedades dieléctricas dentro de la solución superenfriada, o cualquier otra manera de sonda o aparato con cable o sin cable.

Cada una de las partes detalladas en las Figuras 8-11 puede construirse de cualquier material rígido, incluyendo materiales metálicos tales como, pero sin limitarse a aluminio 7075, titanio grado 5, y acero inoxidable 316, compuestos tales como, pero sin limitarse a, polímeros reforzados con fibra de carbono o vidrio, cerámica, plásticos duros, etc.

Cada una de las partes puede tratarse o recubrirse adicionalmente de cualquier manera con el fin de lograr una variedad de efectos de mejora, incluyendo, pero sin limitarse a resistencia a la corrosión, biocompatibilidad, hidrofobicidad, resistencia a la nucleación de hielo o efectos antinucleación, mejora estética, etc.

Los inventores han fabricado estos dispositivos de aluminio 7075, titanio grado 5 y acero inoxidable 316, y varias combinaciones de los mismos, y han verificado que este diseño puede mantener de manera efectiva el sello a presiones de hasta 275 megapascales y temperaturas tan bajas como -196 °C cuando se elige un grosor de pared apropiado.

5

Ejemplo 4: dispositivo de superenfriamiento isocórico principalmente libre de aire con detección de nucleación en tiempo real, control digital y calentamiento por efecto Joule sensible para la contención de eventos de desestabilización

10

En algunas realizaciones del sistema mostrado esquemáticamente en la Figura 2 (no según la invención), se puede emplear un dispositivo configurado como se detalla en la Figura 12. Este dispositivo aprovecha el superenfriamiento isocórico de alta estabilidad para mantener un medio conservado y un producto biológico en un estado superenfriado, y adicionalmente presenta una detección de nucleación basada en presión en tiempo real para monitorizar continuamente la estabilidad. También presenta un controlador externo y un elemento de calentamiento por efecto Joule externo, y emplea un baño de enfriamiento externo para el mantenimiento de la temperatura de superenfriamiento deseada.

15

En esta configuración, si se produce la nucleación de hielo por cualquier razón, el transductor de presión digital detectará un aumento de la presión. El transductor de presión digital transmite a un microcontrolador, y si el valor de presión detectado supera un valor umbral asignado (típicamente una pequeña cantidad mayor que el valor de reposo del sistema), el microcontrolador activará el calentador para elevar la temperatura del sistema hasta justo por encima de su punto de congelación, eliminando así cualquier formación de hielo y permitiendo que el sistema se superenfríe de nuevo.

20

El retorno de la presión a su primer valor de reposo indicará al transductor de presión que todo el hielo en el sistema se ha fundido, y que el calentador deberá apagarse y permitir que el sistema vuelva a superenfriarse. Esta configuración fue construida por los inventores y validada experimentalmente. Se usó un recipiente a presión fabricado a medida construido de titanio de Grado V como recipiente isocórico, la presión se monitorizó usando un transductor de presión digital, el calentamiento por efecto Joule se proporcionó mediante un alambre de cobre enrollado y el control se proporcionó mediante un ordenador portátil que ejecutaba el software informático técnico MATLAB. La presión se representó en tiempo real, junto con la actividad del calentador. El medio superenfriado empleado fue agua desionizada pura, libre de burbujas de aire. Todo el conjunto de recipiente se sumergió en un baño de enfriamiento a temperatura constante mantenido a -6 °C.

25

30

35

En la Figura 13, se proporciona una salida de datos de muestra generada usando este dispositivo. Como se ha marcado, el estado inicial de superenfriamiento estable se indica mediante ningún cambio en la lectura de presión (línea continua). Tras la excitación artificial de la nucleación, la presión aumenta bruscamente, y se envía corriente al relé que controla el calentador (línea de puntos), activando el calentamiento por efecto Joule. En este ejemplo, se suministró calor a una velocidad de 150 vatios y no se utilizó control PID. A medida que el calentamiento continúa, se detiene el aumento de presión, y la presión comienza a disminuir a medida que se funde la pequeña cantidad de hielo interior. Cuando la presión vuelve a estar dentro de un pequeño porcentaje de su valor estacionario original, el calentador se apaga. Se observa entonces que el sistema vuelve a entrar en un estado superenfriado estable a -6 °C y permanece en este estado durante las seis horas restantes del experimento.

40

45

Basándose en la presión y la compresibilidad del agua y el hielo-1h, se calculó que el hielo habitaba aproximadamente el 5% del volumen del recipiente en el pico de su crecimiento. Por tanto, este ejemplo demuestra que la tecnología descrita en este recinto no sólo permite el superenfriamiento de alta estabilidad, sino que, en el caso poco probable de desestabilización y nucleación de hielo, puede emplearse detección de nucleación basada en presión y calentamiento sensible para detener el crecimiento de hielo antes de que pueda superar una parte apreciable del volumen del recipiente, protegiendo por tanto universalmente cualquier producto biológico almacenado.

50

También se emplea e ilustra en esta configuración opcional un recipiente secundario para el producto biológico conservado. Este recipiente puede tener una o más superficies flexibles para permitir el equilibrio de la presión hidrostática entre el contenido interior y el entorno circundante, y puede llenarse con una solución acuosa que se ha liberado de todas o la mayoría de las burbujas de aire. Se puede conservar un número arbitrario de productos biológicos en el mismo recipiente primario, y en el mismo recipiente secundario o en recipientes secundarios separados. La solución acuosa empleada en el recipiente primario no necesita ser la misma que la empleada en el recipiente secundario. En realizaciones preferidas, la solución empleada dentro del recipiente secundario puede tener un punto de congelación más bajo que el del recipiente primario. Esta disposición asegura que si el sistema se desestabiliza, se producirá nucleación de hielo en el recipiente primario, y el producto biológico estará así protegido tanto de daño osmótico como de daño por hielo.

55

60

Referencias

65

[1] Clouet, E., 2009, "Modeling of Nucleation Processes", *ASM Handbook Vol. 22A, Fundamentals of Modeling*

- for *Metals Processing*, D.U. Furrer, y S.L. Semiatin, eds., págs. 203-219.
- [2] Young, S. W., y Van Falcen, W. J., 1913, "The Mechanical Stimulation to Crystallization", *J. Am. Chem. Soc.*
- 5 [3] Luque de Castro, M. D., y Priego-Capote, F., 2007, "Ultrasound-Assisted Crystallization (Sonocrystallization)," *Ultrason. Sonochem.*
- [4] Saclier, M., Peczalski, R., y Andrieu, J., 2010, "A Theoretical Model for Ice Primary Nucleation Induced by Acoustic Cavitation", *Ultrason. Sonochem.*
- 10 [5] Chow, R., Blindt, R., Chivers, R., y Povey, M., 2005, "A Study on the Primary and Secondary Nucleation of Ice by Power Ultrasound," *Ultrasonics.*
- [6] Clouet, E., 2009, "Modeling of Nucleation Processes", *Fundamentals of Modeling for Metals Processing, ASM Handbook.*
- 15 [7] Huang, H., Yarmush, M. L., y Usta, O. B., 2018, "Long-Term Deep-Supercooling of Large-Volume Water and Red Cell Suspensions via Surface Sealing with Immiscible Liquids", *Nat. Commun.*
- [8] Hickling, R., 1965, "Nucleation of Freezing by Cavity Collapse and Its Relation to Cavitation Damage", *Nature.*
- [9] Ohsaka, K., y Trinh, E. H., 1998, "Dynamic Nucleation of Ice Induced by a Single Stable Cavitation Bubble", *Appl. Phys. Lett.*
- 25 [10] StJohn, D. H., et al., 2015, "The Contribution of Constitutional Supercondensation to Nucleation and Grain Formation", *Metall. Material. Trans. A Phys. Metall. Material. Sci.*
- [11] Goldsmid, H. J., 2010, "Methods for the Production of Materials", *Springer Series in Materials Science.*
- 30 [12] Hurle, D. T. J., y Rudolph, P., 2004, "A Brief History of Defect Formation, Segregation, Faceting, and Twinning in Melt-Grown Semiconductors", *Journal of Crystal Growth.*
- [13] Stonehouse, G. G., y Evans, J. A., 2015, "The Use of Supercooling for Fresh Foods: A Review", *J. Food Eng.*
- 35 [14] Giwa, S., et al., 2017, "The Promise of Organ and Tissue Preservation to Transform Medicine", *Nat. Biotechnol.*
- [15] de Vries, R. J., Tessier, S. N., Banik, P. D., Nagpal, S., Cronin, S. E. J., Ozer, S., Hafiz, E. O. A., van Gulik, T. M., Yarmush, M. L., Markmann, J. F., Toner, M., Yeh, H., y Uygun, K., 2019, "Supercooling Extends Preservation Time of Human Livers", *Nat. Biotechnol.*
- 40 [16] Berendsen, T. A., Bruinsma, B. G., Puts, C. F., Saeidi, N., Usta, O. B., Uygun, B. E., Izamis, M. L., Toner, M., Yarmush, M. L., y Uygun, K., 2014, "Supercooling Enables Long-Term Transplantation Survival Following 4 Days of Liver Preservation", *Nat. Med.*
- 45 [17] Taylor, M. J., Weegman, B. P., Baicu, S. C., y Giwa, S. E., 2019, "New Approaches to Cryopreservation of Cells, Tissues, and Organs", *Transfus. Med. Hemoterapia.*
- 50 [18] Fuller, B. J., Petrenko, A., y Guibert, E., 2019, "Human Organs Come out of the Deep Cold", *Nat. Biotechnol.*
- [19] Akio, S., Seiji, O., Akira, T., Hiroshi, U., y Ken'ichi, T., 1992, "Fundamental Research on External Factors Affecting the Freezing of Supercooled Water", *Int. J. Heat Mass Transf.*
- 55 [20] Callen, H. B., y Griffiths, R. B., 1987, "Thermodynamics and an Introduction to Thermostatistics", *Am. J. Phys.*
- [21] Rubinsky, B., Perez, P. A., y Carlson, M. E., 2005, "The Thermodynamic Principles of Isochoric Cryopreservation", *Cryobiology.*
- 60 [22] Alberty, R. A., 2001, "Use of Legendre Transforms in Chemical Thermodynamics", *Pure Appl. Chem.*
- [23] Zia, R. K. P., Redish, E. F., y McKay, S. R., 2009, "Making Sense of the Legendre Transform", *Am. J. Phys.*
- 65 [24] Callen, H. B., 1998, "Thermodynamics and an Introduction to Thermostatistics, 2a ed.", *Am. J. Phys.*

- [25] IAPWS, 2015 Guideline on Thermodynamic Properties of Supercooled Water.
- [26] IAPWS, 2009, Revised Release on the Equation of State 2006 for H₂O Ice 1h.
- 5 [27] Gibbs, J. W., 1878, "On the Equilibrium of Heterogeneous Substances.," Am. J. Sci., 96, págs. 441-458.
- [28] Gordon, P., 1968, Principles of Phase Diagrams in Materials Systems, McGraw-Hill, Inc.
- 10 [29] Mathur, A., Loskill, P., Shao, K., Huebsch, N., Hong, S. G., Marcus, S. G., Marks, N., Mandegar, M., Conklin, B. R., Lee, L. P., y Healy, K. E., 2015, "Human IPSC-Based Cardiac Microphysiological System for Drug Screening Applications", Sci. Rep.
- [30] Zhang, Z., Sun, D. W., Zhu, Z., y Cheng, L., 2015, "Enhancement of Crystallization Processes by Power Ultrasound: Current State-of-the-Art and Research Advances", Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.
- 15 [31] Goyer, G. G., Bhadra, T. C., y Gitlin, S., 1965, "Shock Induced Freezing of Supercooled Water", J. Appl. Meteorol.
- [32] Bazilevskii, A. V., Kalinchenko, V. A., y Rozhkov, A. N., 2018, "Effect of Fluid Viscosity on the Faraday Surface Waves", Fluid Dyn.
- 20 [33] Szobota, S. A., y Rubinsky, B., 2006, "Analysis of Isochoric Subcooling", Cryobiology, 53(1), págs. 139-142.
- [34] Preciado, J. A., y Rubinsky, B., 2010, "Isochoric preservation: A novel characterization method", Cryobiology, 60, págs. 23-29.
- 25

REIVINDICACIONES

1. Un método para inducir un superenfriamiento de alta estabilidad y, opcionalmente, transportable, comprendiendo el método:
- 5 proporcionar un dispositivo que comprende un recipiente rígido que contiene materia biológica en un medio acuoso;
- asegurar la eliminación de esencialmente toda la fase gaseosa a granel del medio acuoso contenido;
- 10 sellar herméticamente el recipiente con un cierre rígido hermético al aire, en donde el porcentaje del volumen de fase gaseosa a granel que queda en el medio acuoso tras sellar herméticamente el recipiente es menor del 5%; y
- 15 enfriar el medio acuoso a una temperatura inferior a 0°C en condiciones termodinámicas isocóricas, en donde el recipiente comprende además un instrumento de detección de presión integrado o no integrado, un instrumento de control y un instrumento de suministro de energía,
- 20 en donde el instrumento de detección de presión mide o detecta presión, en donde se usa un cambio en la presión para detectar la formación o eliminación de hielo dentro del medio acuoso,
- en donde el instrumento de suministro de energía usa un mecanismo de suministro de energía seleccionado del grupo que consiste en calentamiento conductor, calentamiento convectivo, calentamiento radiativo,
- 25 calentamiento inductivo, calentamiento por efecto Joule, calentamiento electromagnético, calentamiento por radio y calentamiento ultrasónico,
- en donde el instrumento de suministro de energía suministra energía para fundir, disolver o eliminar de otro modo núcleos o cristales de hielo, y
- 30 en donde tras la detección de un cambio de presión, se activa una rutina dentro del instrumento de control, en donde el instrumento de control monitoriza continuamente la presión, y la rutina activa el instrumento de suministro de energía cuando la lectura de presión supera un primer valor umbral dado, y apaga el instrumento de suministro de energía cuando la presión vuelve por debajo del primer valor umbral o un valor umbral diferente.
- 35
2. El método según la reivindicación 1, en donde el instrumento de detección de presión comprende un transductor de presión digital, transductor de presión analógico, manómetro digital, manómetro analógico, fuente de resistencia eléctrica, sensor piezoeléctrico, sensor piezospectroscópico, medidor de tensión, sensor de presión óptica, sensor de presión acondicionado o sensor de presión capacitivo.
- 40
3. El método según la reivindicación 1, en donde el instrumento de control comprende un ordenador, microprocesador, microcontrolador, controlador PID o software.
- 45
4. El método según la reivindicación 1, que comprende además una medida protectora suplementaria para proteger contra la agitación, nucleación de hielo, daño o desesterilización, en donde:
- la medida protectora protege de las vibraciones y comprende un manguito, funda, revestimiento, soporte, recipiente, embalaje, aparato cargado por resorte o gancho reductores de vibraciones.
- 50
5. El método según la reivindicación 1, que comprende además una medida protectora suplementaria para proteger contra la agitación, nucleación de hielo, daño o desesterilización, en donde:
- la medida protectora protege de cambios de temperatura y comprende un manguito, funda, revestimiento, soporte, recipiente o embalaje térmicamente aislante; o
- 55 la medida protectora protege del cambio de temperatura e incorpora un material de cambio de fase, preferiblemente un material de cambio de fase que es hielo, cera, soluciones acuosas o sales eutécticas.
- 60
6. El método según la reivindicación 1, que comprende además una medida protectora suplementaria para proteger contra la agitación, nucleación de hielo, daño o desesterilización, en donde
- la medida protectora protege contra la nucleación heterogénea de hielo en las interfases líquido-sólido y comprende un tratamiento o revestimiento de superficie realizado en el interior del recipiente o a cualquier componente que entre en contacto con el medio acuoso; en donde:
- 65

el tratamiento o el revestimiento de superficie funciona para aumentar la hidrofobicidad o la superhidrofobicidad de la superficie, en donde

5 el tratamiento o revestimiento de superficie comprende politetrafluoroetileno, perfluorocarbonos, silanos fluorados, fluoropolímeros, carbonato de calcio, óxido de zinc, óxido de manganeso, o derivados o combinaciones de los mismos.

7. El método según la reivindicación 1, que comprende además una medida protectora suplementaria para proteger contra la agitación, nucleación de hielo, daño o desesterilización, en donde,

10

la medida protectora protege contra la corrosión, la no biocompatibilidad, el rayado o el daño mecánico, en donde

15

la medida protectora comprende un tratamiento superficial anodizado, niquelado o zincado.

8. El método según la reivindicación 1, en donde la materia biológica es:

20

un órgano, es decir, un corazón, pulmón, riñón, hígado, bazo, páncreas, cerebro, vejiga, estómago, intestino, ovario, pene, testículo, ojo, o partes o componentes de los mismos;

una construcción multicelular, que es un islote pancreático, vaso sanguíneo o médula ósea;

sangre; o

25

un tejido reproductivo.

9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la materia biológica se coloca en un recipiente secundario dentro del medio acuoso, en donde:

30

el recipiente secundario tiene al menos una superficie flexible para permitir el equilibrio de la presión hidrostática entre el contenido del recipiente secundario y el medio acuoso circundante;

el recipiente secundario se llena con una solución acuosa con una temperatura de congelación en equilibrio inferior a la del medio acuoso circundante;

35

el recipiente secundario es una bolsa, globo, tubo cubierto o vial cubierto.

10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la materia biológica se recubre, sumerge o encapsula en un hidrogel reticulado o no reticulado, preferiblemente en donde el hidrogel es alginato, ácido hialurónico o derivados o combinaciones de los mismos.

40

11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde si se formase hielo dentro del medio acuoso, se deja que el hielo forme un equilibrio líquido-sólido bifásico.

45

12. Un dispositivo para inducir un superenfriamiento de medios acuosos de alta estabilidad y, opcionalmente, transportable, que comprende:

un recipiente rígido configurado para contener materia biológica en un medio acuoso, en donde cualquier fase gaseosa a granel en el mismo comprende menos del 5% del volumen del recipiente;

50

un cierre rígido hermético al aire para sellar el recipiente y mantener las condiciones termodinámicas isocóricas en su interior;

estando configurado el recipiente para enfriar el medio acuoso a una temperatura inferior a 0°C en condiciones termodinámicas isocóricas,

55

en donde el recipiente está equipado con un instrumento de detección de presión integrado o no integrado, un instrumento de control y un instrumento de suministro de energía,

en donde el instrumento de detección de presión está configurado para medir o detectar presión, en donde el dispositivo está configurado para detectar un cambio en la presión que indica la formación o eliminación de hielo dentro del medio acuoso,

60

en donde el instrumento de suministro de energía usa un mecanismo de suministro de energía seleccionado del grupo que consiste en calentamiento conductor, calentamiento convectivo, calentamiento radiativo, calentamiento inductivo, calentamiento por efecto Joule, calentamiento electromagnético, calentamiento por

65

radio o calentamiento ultrasónico,

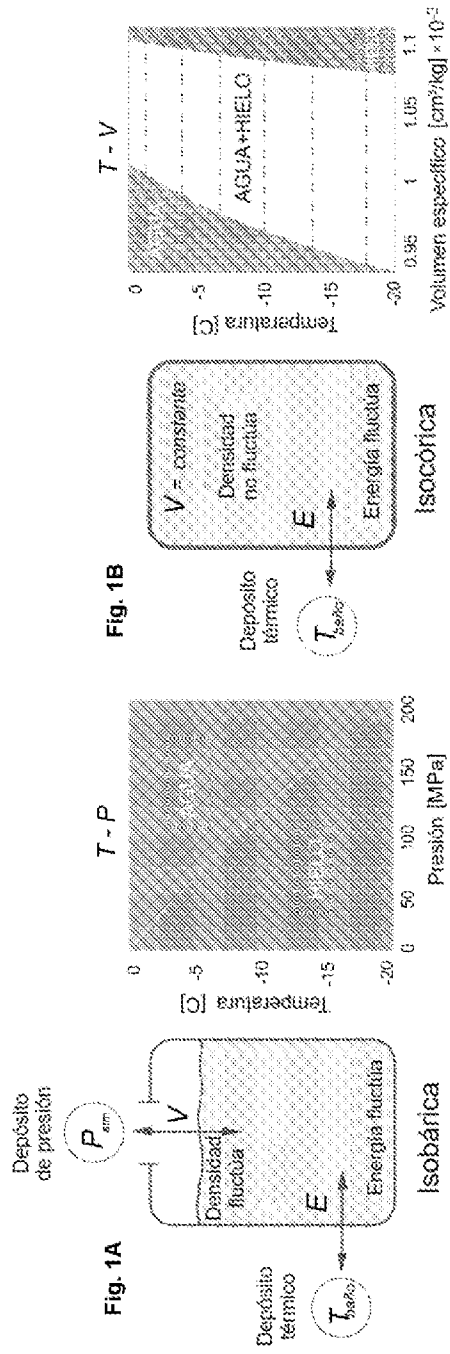
en donde el instrumento de suministro de energía está configurado para suministrar energía para fundir, disolver o eliminar de otro modo núcleos o cristales de hielo, y

5

en donde el dispositivo está configurado de tal manera que al detectar un cambio de presión, se activa una rutina dentro del instrumento de control, en donde el instrumento de control monitoriza continuamente la presión, y la rutina activa el instrumento de suministro de energía cuando la lectura de presión supera un primer valor umbral dado, y apaga el instrumento de suministro de energía cuando la presión vuelve por debajo del primer valor umbral o un valor umbral diferente.

10

DIBUJOS



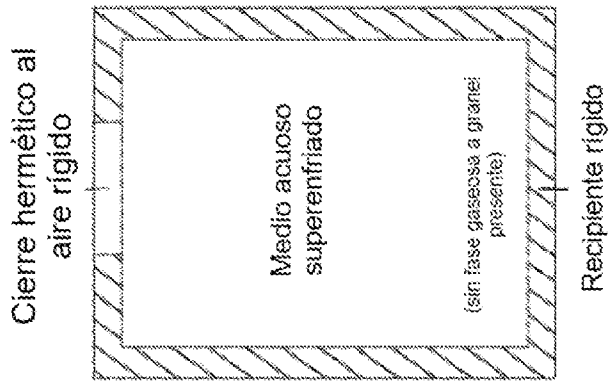


Fig. 2

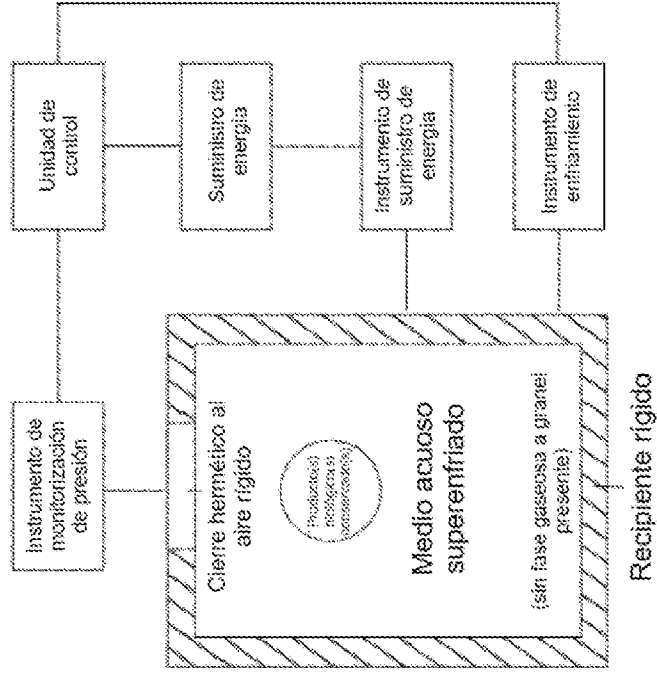
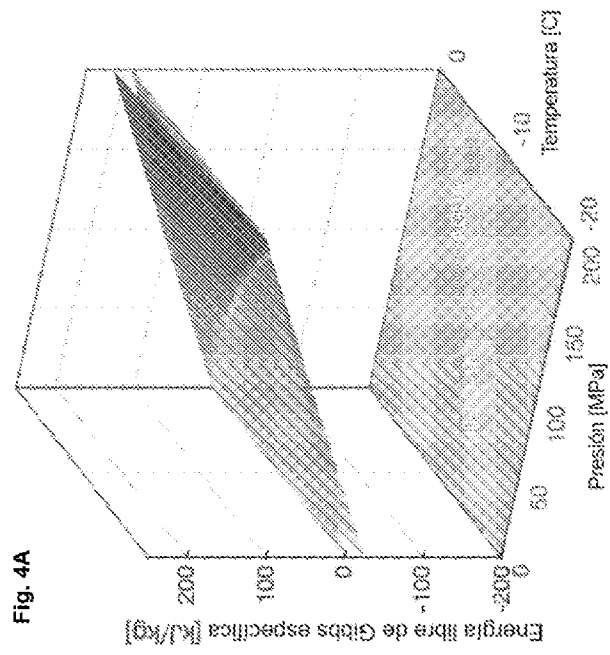
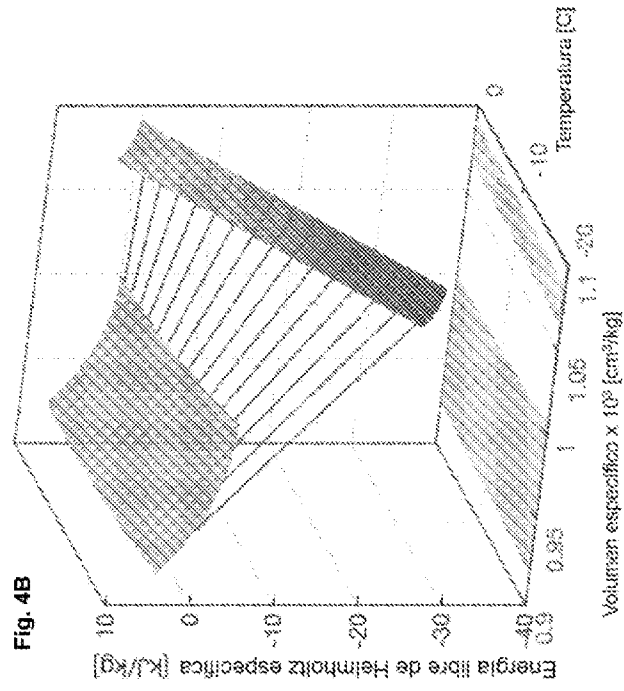
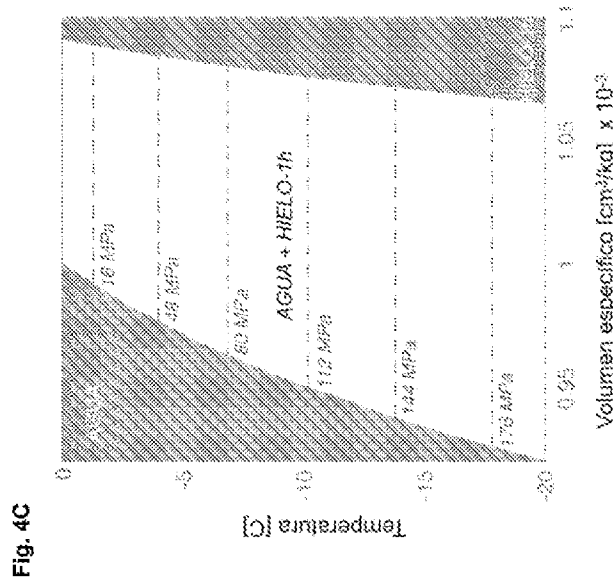
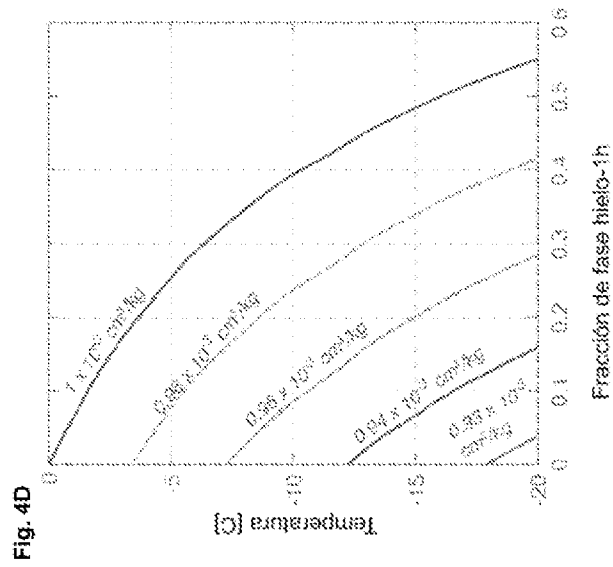


Fig. 3





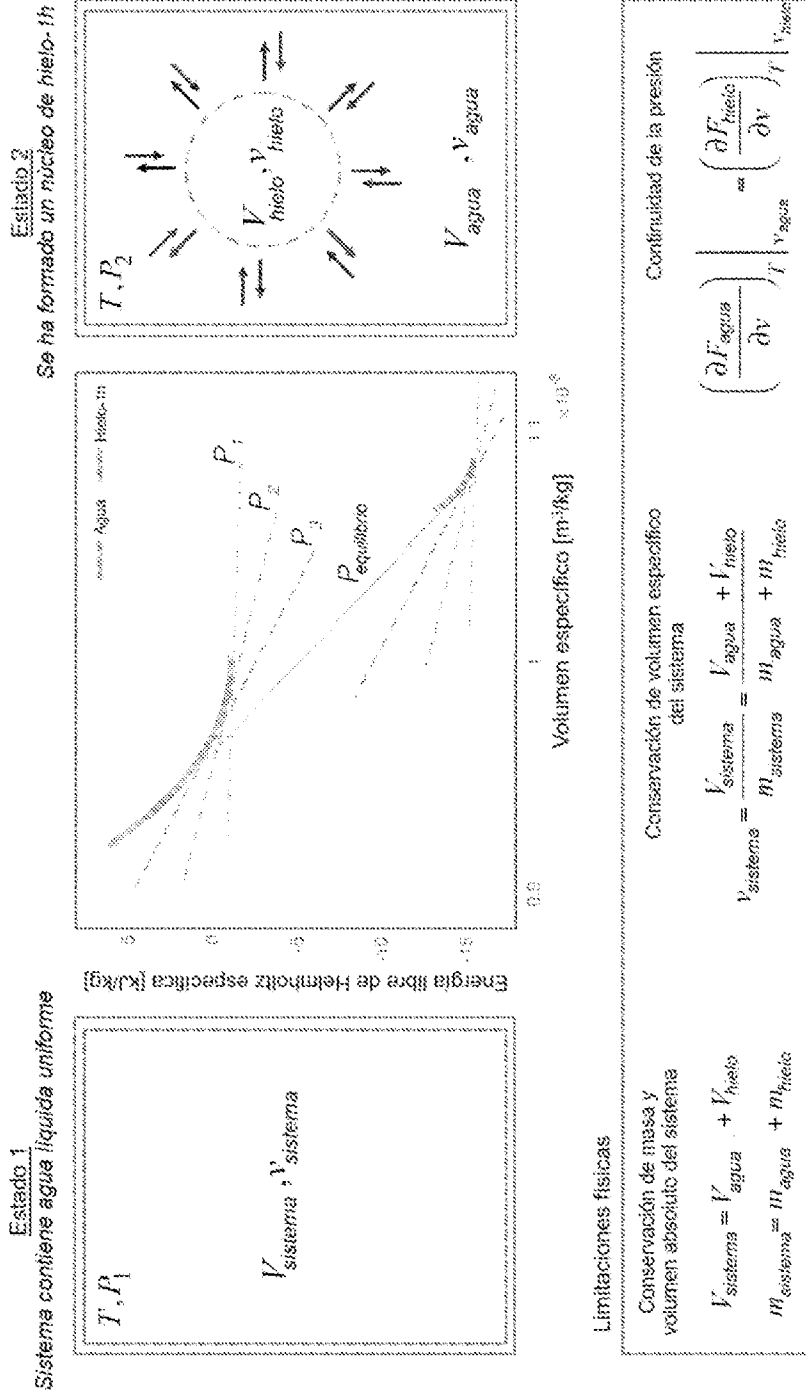
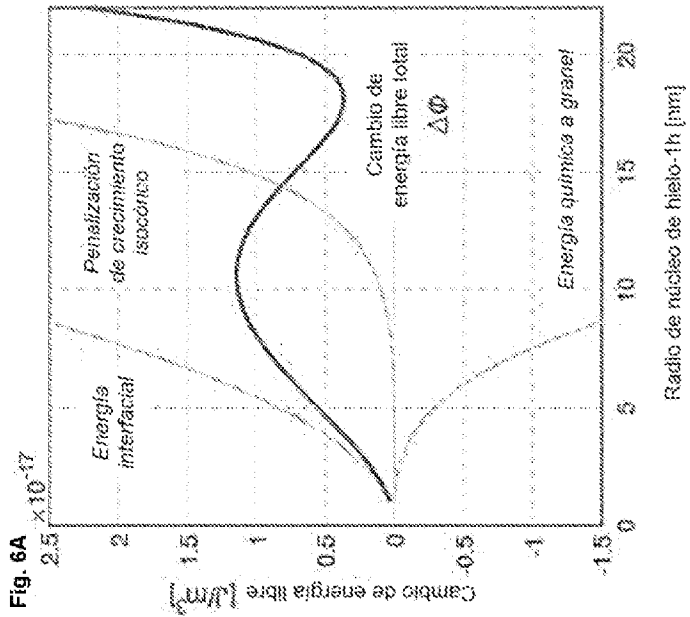
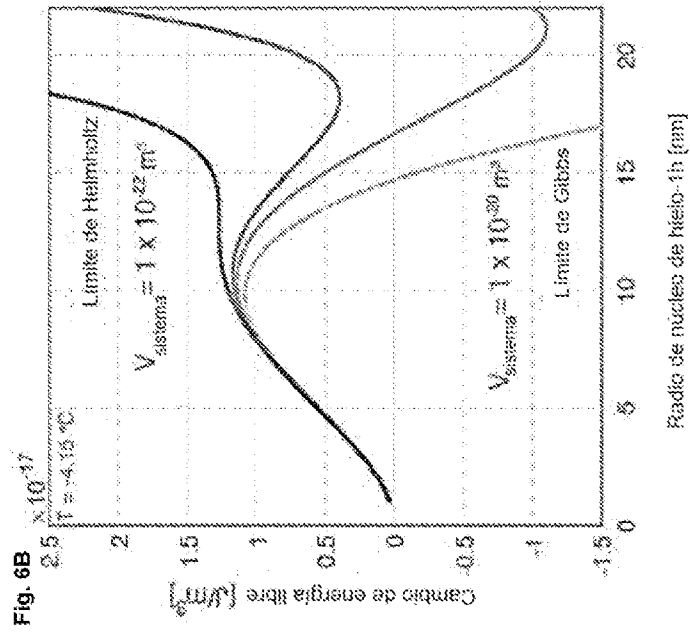
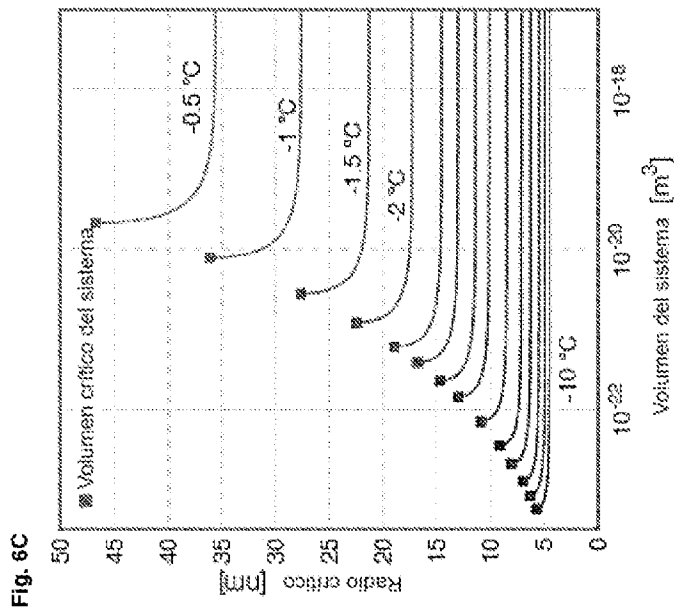
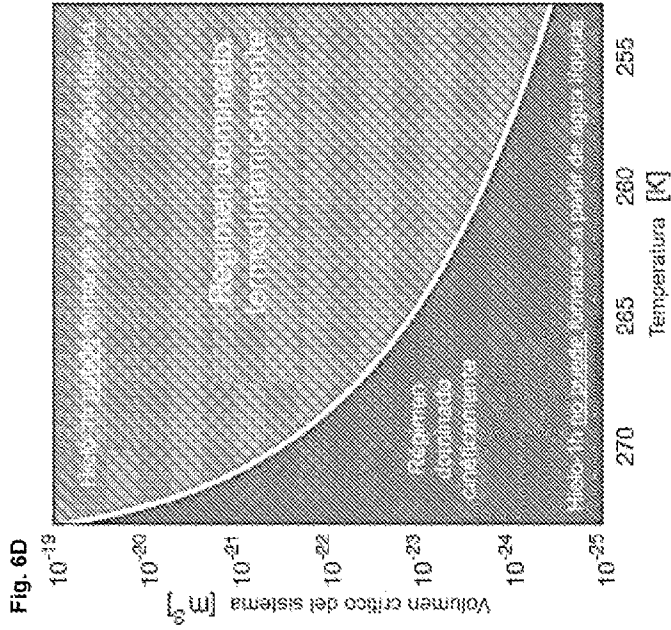


Fig. 5





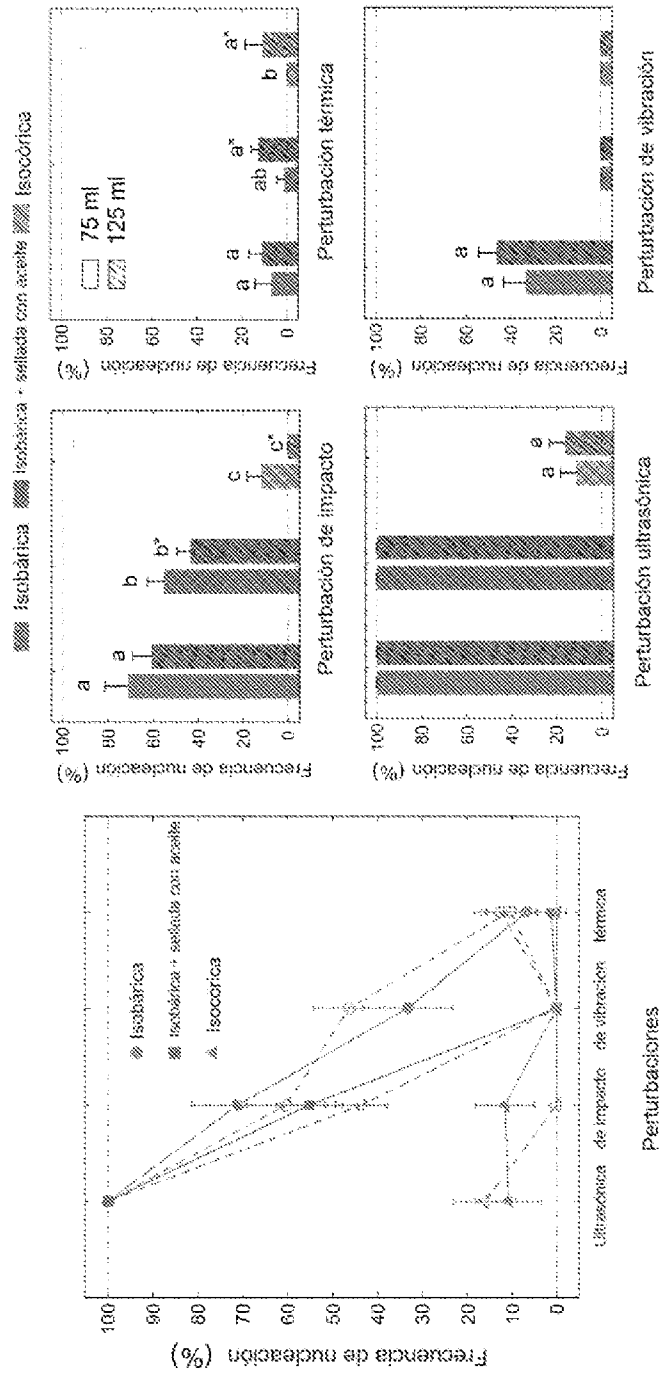


Fig. 7A

Fig. 7B

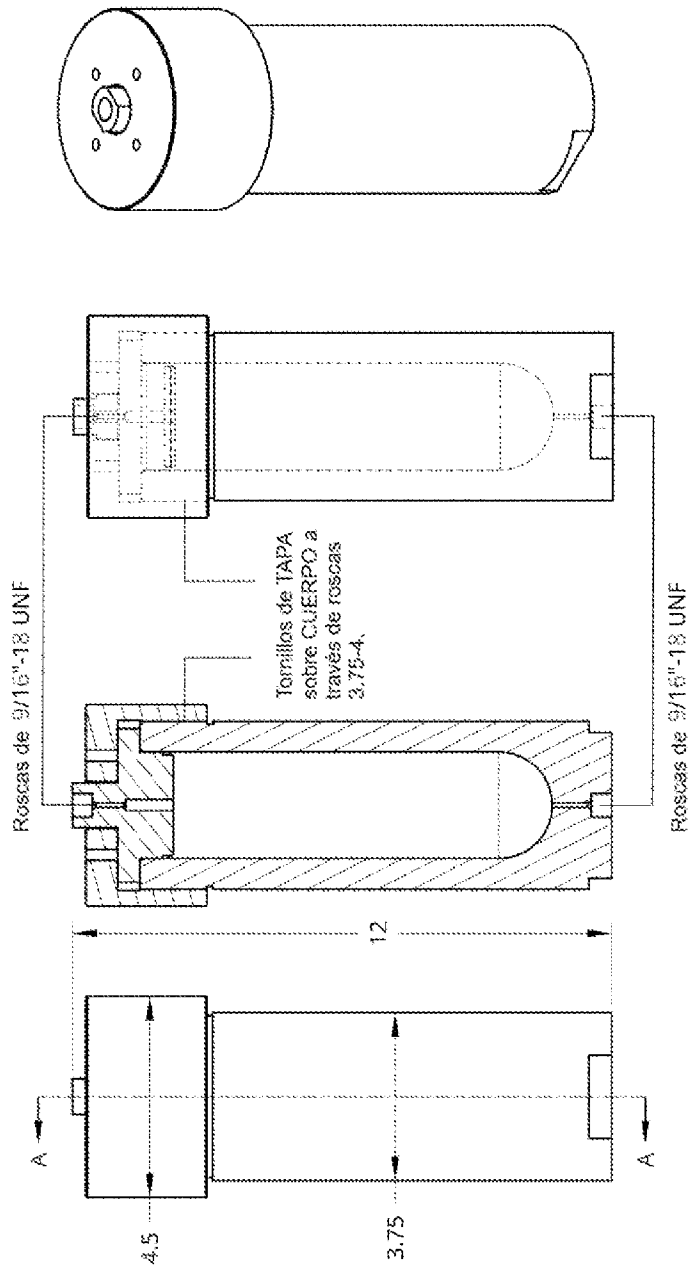


Fig. 8

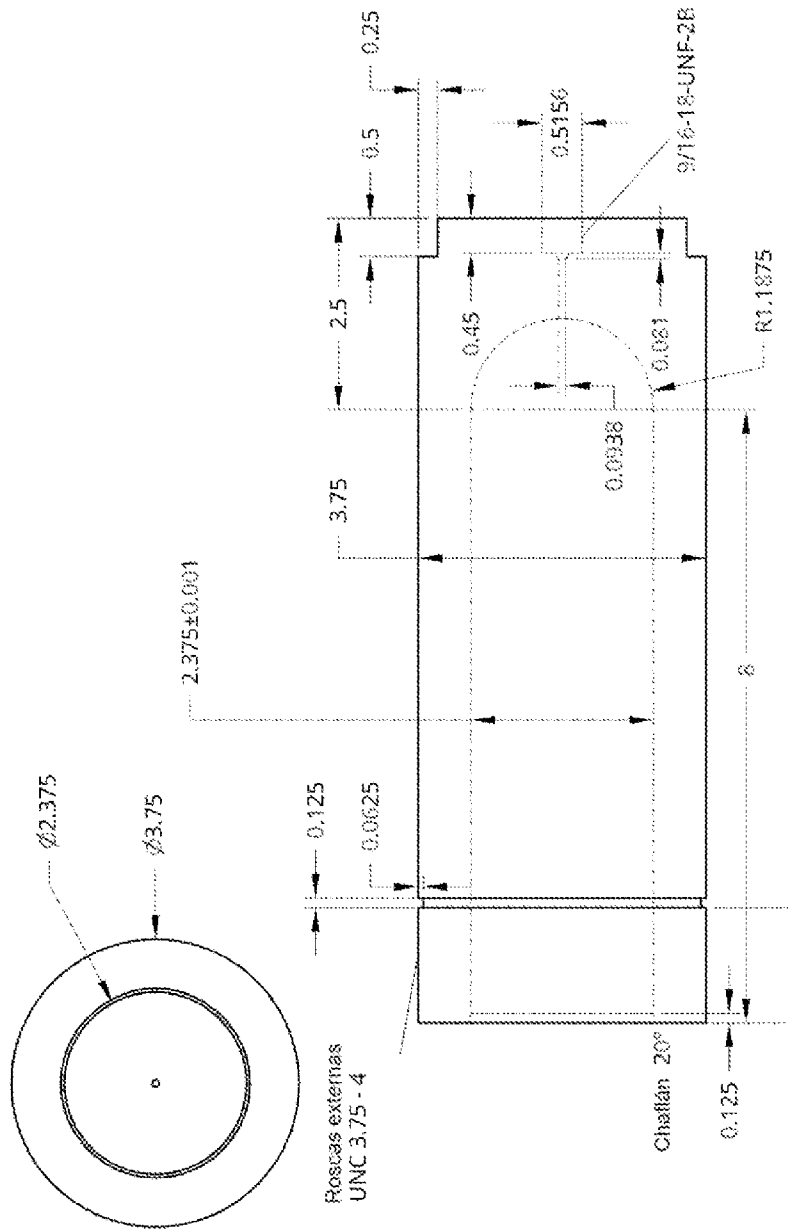


FIG. 9

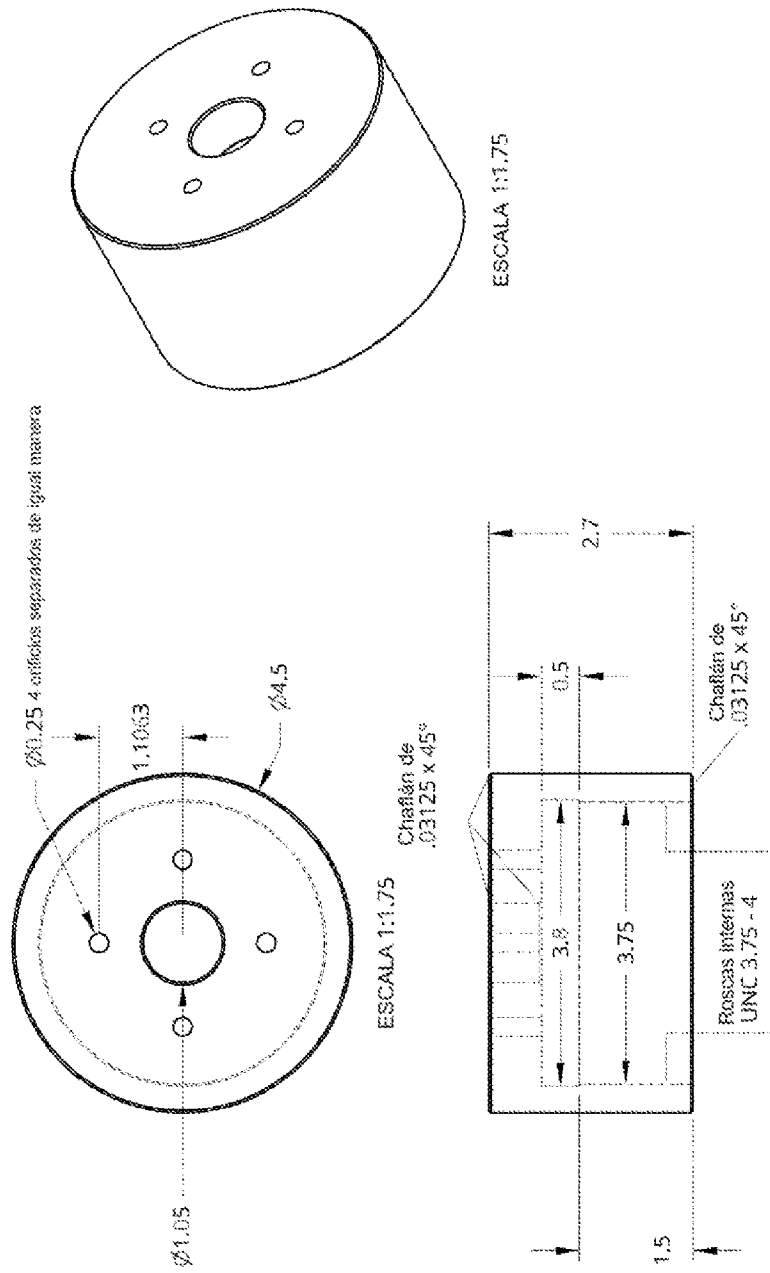


Fig. 10

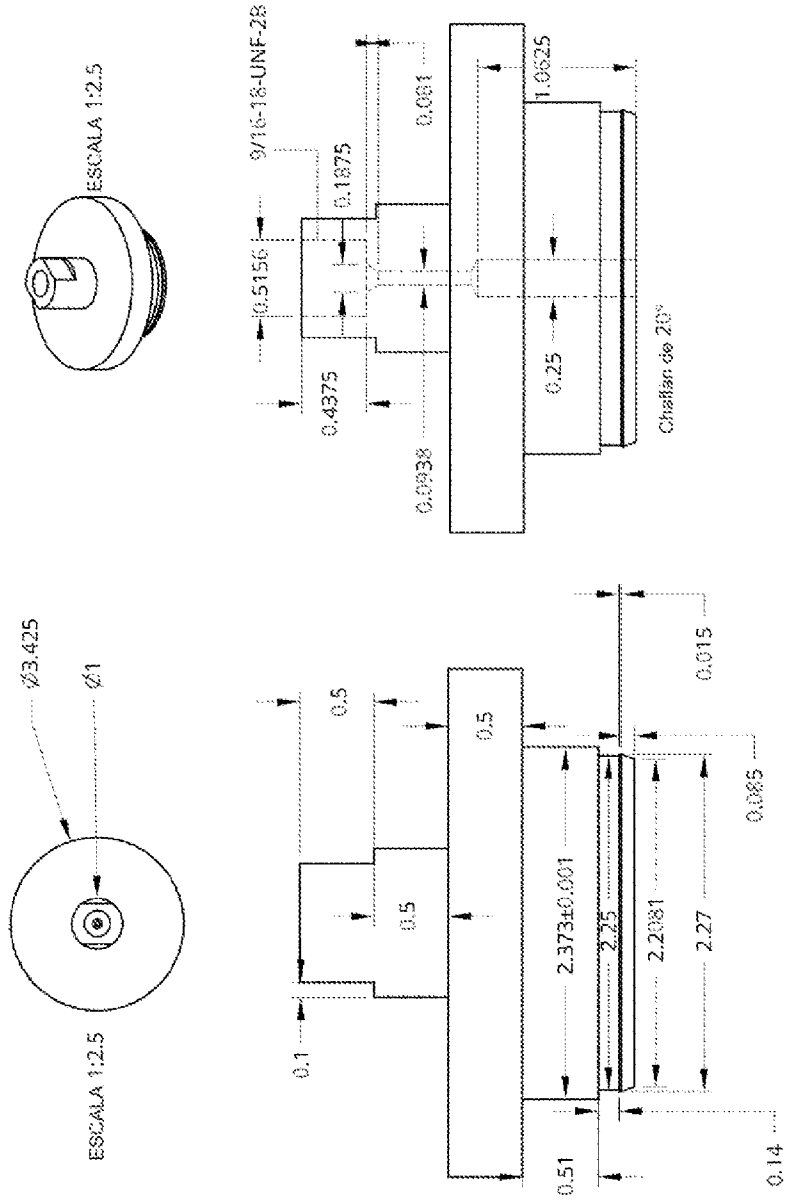


Fig. 11

